

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 384**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 1/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2014 PCT/US2014/019773**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO2014137860**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2014 E 14760824 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2906947**

54 Título: **Ensayo de flujo lateral de múltiples planos con zona de desvío**

30 Prioridad:

07.03.2013 US 201313788616

08.03.2013 US 201313790125

08.03.2013 US 201313790160

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**RAPID PATHOGEN SCREENING INC. (100.0%)
7227 Delainey Court
Sarasota, FL 34240, US**

72 Inventor/es:

**BABU, UMA MAHESH;
SAMBURSKY, ROBERT P.;;
CONDON, PETER y
VANDINE, ROBERT W.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 620 384 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

Ensayo de flujo lateral de múltiples planos con zona de desvío

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención se refiere al campo de pruebas de diagnóstico analítico inmediato. Más particularmente, la invención se refiere a ensayos de flujo lateral.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los ensayos de flujo lateral son un subconjunto de ensayos que combinan diversos reactivos y etapas del proceso en una tira reactiva, proporcionando de este modo un medio sensible y rápido para la detección de moléculas diana. Hay disponibles inmunoensayos de flujo lateral a base de anticuerpos para una amplia gama de analitos diana y se pueden diseñar para principios de prueba en sándwich o competitiva. En general, los analitos con elevado peso molecular con varios epítomos se analizan en formato sándwich mientras que las moléculas pequeñas que representan solo un epítomo se detectan por medio de un ensayo competitivo. Las primeras pruebas se realizaron para gonadotropina coriónica humana (hCG). Hoy existen pruebas disponibles en el mercado para monitorizar la ovulación, detectar organismos de enfermedades infecciosas, analizar drogas, y medir otros analitos importantes para la fisiología humana. También se han presentado productos para pruebas veterinarias, pruebas medioambientales y monitorización de productos.

25 En la técnica anterior, el receptor marcado móvil (también conocido como el rastreador o el conjugado de prueba en el presente documento) en estos ensayos está seco sobre la tira, contenido en una solución de elución externa (de tal modo que se pueda mezclar previamente con la muestra antes de la aplicación sobre la tira reactiva), o es parte de los medios de elución.

30 La publicación de patente europea EP0582231, publicada el 9 de febrero de 1994, titulada "SOLID PHASE ASSAY", divulga un ensayo con un soporte sólido poroso con una primera parte que contacta con una muestra que puede incluir un analito de interés. La muestra fluye a través del soporte sólido y el analito, si se encuentra presente, se combina con un rastreador, que está unido de forma reversible sobre el soporte sólido. La muestra y el rastreador inicialmente se desplazan en una dirección perpendicular a la primera parte (por ejemplo, en sentido vertical) mediante flujo por capilaridad. El rastreador y el analito siguen desplazándose a continuación mediante flujo por capilaridad a través del material hasta una segunda parte que incluye un aglutinante inmovilizado, que se une al analito en un inmunoensayo de formato en sándwich. El desplazamiento hasta la segunda parte se produce en una dirección perpendicular a la dirección en la que el rastreador y la muestra se desplazan inicialmente (por ejemplo, en sentido lateral). Todo el desplazamiento de la muestra y el rastreador se produce debido al flujo por capilaridad a través del dispositivo. A pesar de que el desplazamiento se produce en sentido vertical y lateral, existe una única trayectoria de flujo. La muestra, el rastreador y el aglutinante inmovilizado están, todos, en la misma trayectoria de flujo.

45 La publicación de patente de EE. UU. con n.º 2007/0224701, publicada el 27 de septiembre de 2007, titulada "COMBINATION VERTICAL AND LATERAL FLOW IMMUNOASSAY DEVICE", divulga dispositivos de inmunoensayo, kits y métodos para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra de líquido usando una combinación de flujo vertical y flujo lateral. El dispositivo incluye una almohadilla rastreadora con un receptor marcado que está verticalmente yuxtapuesto con un medio de soporte del aglutinante. El dispositivo que se divulga en esta publicación tiene múltiples secciones pero, de forma similar al documento EP0582231, solo tiene una única trayectoria de flujo. La muestra, el receptor marcado, y el medio de soporte del aglutinante están todos en la misma trayectoria de flujo.

Sumario de la invención

55 En una realización preferida, un dispositivo de flujo lateral para detectar un analito en una muestra incluye un compresor de muestras y una tira reactiva. La tira reactiva incluye una zona de prueba y una zona de desvío aguas arriba de la zona de prueba, en la que la zona de desvío interrumpe el flujo lateral sobre la tira reactiva. El dispositivo de flujo lateral también incluye un conjugado que incluye un primer socio de unión para el analito y un marcador y un segundo socio de unión para el analito. Una zona de aplicación de muestra, en la que se aplica una muestra al dispositivo de flujo lateral, está ubicada en una ubicación que está seleccionada de entre el grupo que consiste en: i) sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección; ii) sobre el compresor de muestras; y iii) sobre un colector de muestras que comprende una porción de recogida de muestras para la recogida de la muestra. Un componente que está seleccionado de entre el grupo que consiste en el conjugado, el segundo socio de unión y tanto el conjugado como el segundo socio de unión no está ubicado sobre la tira reactiva antes del uso del dispositivo de flujo lateral. El compresor de muestras crea un puente por encima de la zona de desvío para desviar el flujo sobre el compresor de muestras y devolver el flujo a la tira reactiva en el extremo de la zona de desvío. En algunas

realizaciones preferidas, la zona de desvío incluye una separación. En otras realizaciones preferidas, la zona de desvío incluye una barrera.

5 En otra realización preferida, un método realiza un ensayo de una muestra sobre un dispositivo de flujo lateral que incluye una tira reactiva y un compresor de muestras. La muestra se coloca sobre el dispositivo de flujo lateral y el flujo lateral se interrumpe sobre la tira reactiva mediante la inclusión de una zona de desvío sobre la tira reactiva. El flujo interrumpido se desvía al compresor de muestras mediante la aplicación de una presión al dispositivo usando el compresor de muestras y el flujo se devuelve a la tira reactiva en el extremo de la zona de desvío. En algunas realizaciones preferidas, la muestra se coloca sobre una zona de aplicación de muestra que está ubicada en una
10 ubicación que está seleccionada de entre el grupo que consiste en: i) sobre la tira reactiva aguas arriba de una zona de detección; ii) sobre el compresor de muestras; y iii) sobre un colector de muestras que comprende una porción de recogida de muestras para la recogida de la muestra.

15 En otra realización preferida, un compresor de muestras aplica presión a un colector de muestras en la zona de aplicación de muestra de una tira reactiva para transferir una muestra sobre el colector de muestras y un socio de unión de analito a la zona de aplicación de muestra en un dispositivo de flujo lateral. Al menos uno de los socios de unión del analito no está ubicado sobre la tira reactiva o en la solución de elución antes del uso del dispositivo de flujo lateral. En una realización preferida, la tira reactiva incluye una zona de desvío impasable, tal como una barrera, separación o surco que fuerza el flujo a través del dispositivo para que se desvíe hacia el compresor de muestras.
20 La tira reactiva puede ser una tira reactiva universal sin ninguna molécula que se une específicamente al analito sobre la tira reactiva. El compresor de muestras puede ser un compresor de muestras universal sin ninguna molécula que se une específicamente al analito sobre el compresor de muestras. El dispositivo de flujo lateral también puede incluir un elemento de intensificación, en donde el elemento de intensificación se une al sándwich del analito para incrementar una señal de detección en la zona de prueba.

25 En una realización de la presente invención, el dispositivo de flujo lateral para detectar un analito incluye un compresor de muestras, un colector de muestras con una parte de recogida de muestras, una tira reactiva con una zona de aplicación de muestra, una zona de desvío y una zona de prueba, un conjugado que incluye un primer socio de unión para el analito y un marcador, y un segundo socio de unión para el analito. El conjugado o el segundo socio de unión o tanto el conjugado como el segundo socio de unión no están ubicados sobre la tira reactiva antes del uso del dispositivo de flujo lateral. El compresor de muestras, el colector de muestras y la tira reactiva forman una pila vertical para aplicar la muestra a la tira reactiva por compresión. El compresor de muestras, preferiblemente, tiene una almohadilla / superficie afelpada con el conjugado y/o el segundo socio de unión estando ubicados sobre la almohadilla antes del uso del dispositivo de flujo lateral. En algunas realizaciones, el dispositivo de flujo lateral
30 incluye un primer socio de unión de control ubicado sobre la almohadilla de compresor de muestras y un segundo socio de unión de control inmovilizado en una zona de control de la tira reactiva, en donde el primer socio de unión de control es un socio de unión para el segundo socio de unión de control. El dispositivo de flujo lateral está formado, preferiblemente, de tal modo que un resultado positivo se consigue solo mediante aislamiento del analito en la zona de prueba mediante unión del analito al primer socio de unión y al segundo socio de unión. La zona de prueba, preferiblemente, no incluye ninguna molécula que se une específicamente al analito. Preferiblemente, el segundo socio de unión incluye una marca y la zona de prueba incluye un socio de unión inmovilizado para la marca.

Breve descripción de los dibujos

- 45 La figura 1 muestra una tira reactiva y un colector de muestras en un dispositivo de flujo lateral.
La figura 2A muestra un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
La figura 2B muestra otro compresor de muestras en una realización de la presente invención.
50 La figura 2C muestra un colector de muestras en una realización de la presente invención.
La figura 3A muestra una tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.
La figura 3B muestra un sándwich completo que incluye el analito, el conjugado y un socio de unión inmovilizado en una realización de la presente invención.
La figura 3C muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 3A, un colector de muestras y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
55 La figura 4A muestra otra tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.
La figura 4B muestra un sándwich completo que incluye el analito, el conjugado y un segundo socio de unión marcado en una realización de la presente invención.
La figura 4C muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 4A, un colector de muestras y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
60 La figura 5A muestra otra tira reactiva de flujo lateral más, en una realización de la presente invención.
La figura 5B muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 5A, un colector de muestras y un compresor de muestras en otra realización de la presente invención.
La figura 6A muestra otra tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.
65 La figura 6B muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 6A, un colector de muestras y un compresor de muestras, en otra realización de la presente invención.
La figura 7A muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 3C, excepto que la zona de prueba se

	encuentra en la zona de aplicación de muestra en una realización de la presente invención.
La figura 7B	muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 4C, excepto que la zona de prueba se encuentra en la zona de aplicación de muestra en una realización de la presente invención.
5 La figura 7C	muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 5B, excepto que la zona de prueba se encuentra en la zona de aplicación de muestra en una realización de la presente invención.
La figura 7D	muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 6B, excepto que la zona de prueba se encuentra en la zona de aplicación de muestra en una realización de la presente invención.
La figura 8A	muestra un dispositivo de flujo lateral en una realización de la presente invención.
La figura 8B	muestra otro dispositivo de flujo lateral en una realización de la presente invención.
10 La figura 9	muestra una pila vertical en una realización de la presente invención.
La figura 10	muestra un sándwich con conjugado de oro de la técnica anterior en la zona de prueba.
La figura 11	muestra un sándwich con intensificación de señales en la zona de prueba en una realización de la presente invención.
15 La figura 12	muestra un sándwich con apilamiento en la zona de prueba en una realización de la presente invención.
La figura 13	muestra una vista en despiece ordenado esquemática de un dispositivo de flujo lateral con elementos de intensificación de señales en algunas realizaciones de la presente invención.
La figura 14	muestra un dispositivo de flujo lateral en otra realización de la presente invención.
20 La figura 15A	muestra una pila que se forma en una realización de la presente invención.
La figura 15B	muestra la pila de la figura 15A inmovilizada en la zona de prueba.
La figura 15C	muestra un complejo que se forma en la zona de control.
La figura 16	muestra un dispositivo de flujo lateral en otra realización de la presente invención.
La figura 17A	muestra una pila que se forma en una realización de la presente invención.
La figura 17B	muestra la pila de la figura 17A inmovilizada en la zona de prueba.
25 La figura 18	muestra un dispositivo de flujo lateral en otra realización de la presente invención.
La figura 19A	muestra una pila que se forma en una realización de la presente invención.
La figura 19B	muestra la pila de la figura 19A inmovilizada en la zona de prueba.
La figura 20A	muestra una tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.
30 La figura 20B	muestra un sándwich "completo", que se forma, preferiblemente, antes de alcanzar la línea de prueba, entre el analito, el conjugado marcado y un segundo socio de unión móvil marcado.
La figura 21A	muestra otra realización de una tira reactiva de flujo lateral con elementos intensificadores.
La figura 21B	muestra el complejo apilado en la línea de prueba en presencia de analito.
La figura 21C	muestra un complejo apilado con la línea de prueba con elementos intensificadores adicionales.
35 La figura 22A	muestra la encapsulación de una fuente de amplificación en una realización de la presente invención.
La figura 22B	muestra la encapsulación de agente de revelado de plata en una realización de la presente invención.
La figura 22C	muestra la encapsulación de sales de plata y agente de revelado de plata de forma conjunta en una realización de la presente invención.
40 La figura 23A	muestra la encapsulación de un primer conjugado en una realización de la presente invención.
La figura 23B	muestra la encapsulación de un segundo conjugado (un conjugado de apilamiento) en una realización de la presente invención.
La figura 24A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una barrera en otra realización de la presente invención.
45 La figura 24B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 24A después de la compresión.
La figura 25A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una separación en otra realización de la presente invención.
La figura 25B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 25A después de la compresión.
La figura 26A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
50 La figura 26B	muestra una vista en perspectiva del dispositivo de flujo lateral de la figura 26A.
La figura 27A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío, un compresor de muestras, un dispositivo de recogida de muestras que comprende un papel de separación, y una tira reactiva cromatográfica en una realización de la presente invención.
La figura 27B	muestra una vista desde arriba de una sección de la tira reactiva en la realización de la figura 27A.
55 La figura 27C	muestra una vista desde arriba de una sección de la tira reactiva después de que el papel de separación se haya colocado encima de la zona de aplicación de muestra en la realización de la figura 27B.
La figura 28	muestra un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío, un compresor de muestras, un dispositivo de recogida de muestras que comprende un papel de separación, y una tira reactiva cromatográfica en una realización de la presente invención.
60 La figura 29A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una barrera en otra realización de la presente invención.
La figura 29B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 29A después de la compresión.
La figura 30A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una separación en otra realización de la presente invención.
65 La figura 30B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 30A después de la compresión.
La figura 31A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una barrera en otra realización de la presente invención.

	La figura 31B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 31A después de la compresión.
	La figura 32A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una separación en otra realización de la presente invención.
5	La figura 32B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 32A después de la compresión.
	La figura 33A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
	La figura 33B	muestra una vista en perspectiva del dispositivo de flujo lateral de la figura 33A.
	La figura 34A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
10	La figura 34B	muestra una vista en perspectiva del dispositivo de flujo lateral de la figura 34A.
	La figura 35A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una barrera en otra realización de la presente invención.
	La figura 35B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 35A después de la compresión.
	La figura 36A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una separación en otra realización de la presente invención.
15	La figura 36B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 36A después de la compresión.
	La figura 37A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
	La figura 37B	muestra una vista en perspectiva del dispositivo de flujo lateral de la figura 37A.
20	La figura 38A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío, un compresor de muestras, un dispositivo de recogida de muestras que incluye un papel de separación, y una tira reactiva cromatográfica en una realización de la presente invención.
	La figura 38B	muestra una vista desde arriba de una sección de la tira reactiva en la realización de la figura 38A.
	La figura 38C	muestra una vista desde arriba de una sección de la tira reactiva después de que el papel de separación se haya colocado encima de la zona de aplicación de muestra en la realización de la figura 38B.
25	La figura 39	muestra un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío, un compresor de muestras, un dispositivo de recogida de muestras que incluye un papel de separación, y una tira reactiva cromatográfica en una realización de la presente invención.
	La figura 40A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una barrera en otra realización de la presente invención.
30	La figura 40B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 40A después de la compresión.
	La figura 41A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una separación en otra realización de la presente invención.
	La figura 41B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 41A después de la compresión.
35	La figura 42A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una barrera en otra realización de la presente invención.
	La figura 42B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 42A después de la compresión.
	La figura 43A	muestra un dispositivo de flujo lateral con una separación en otra realización de la presente invención.
	La figura 43B	muestra el dispositivo de flujo lateral de la figura 43A después de la compresión.
40	La figura 44A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
	La figura 44B	muestra una vista en perspectiva del dispositivo de flujo lateral de la figura 44A.
	La figura 45A	muestra una vista lateral de un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.
45	La figura 45B	muestra una vista en perspectiva del dispositivo de flujo lateral de la figura 45A.
	La figura 46A	muestra un dispositivo de análisis de muestras completamente abierto con tiras reactivas duales, así como una zona de conjugado y una zona de aplicación de muestra sobre un compresor de muestras en un plano separado de las tiras reactivas en una realización de la presente invención.
	La figura 46B	muestra el dispositivo de análisis de muestras de la figura 46A con parte de la carcasa cerrada, pero la zona de conjugado aún visible en el lado izquierdo del dispositivo.
50	La figura 46C	muestra el dispositivo de análisis de muestras de la figura 46A después de que se haya iniciado la prueba.
	La figura 47A	muestra un resultado de prueba negativo tanto para MxA como para CRP en una realización de la presente invención.
	La figura 47B	muestra un resultado de prueba positivo para MxA en una realización de la presente invención.
55	La figura 47C	muestra un resultado de prueba positivo para MxA en una realización de la presente invención.
	La figura 47D	muestra un resultado de prueba positivo para CRP en una realización de la presente invención.
	La figura 47E	muestra un resultado de prueba positivo para CRP en una realización de la presente invención.
	La figura 47F	muestra un resultado de prueba positivo tanto para CRP como para MxA, indicando una infección conjunta, en una realización de la presente invención.
60	La figura 48A	muestra un dispositivo de análisis de muestras completamente abierto con tiras reactivas duales y una zona de conjugado sobre un compresor de muestras en un plano separado de las tiras reactivas en una realización de la presente invención.
	La figura 48B	muestra el dispositivo de análisis de muestras de la figura 48 con parte de la carcasa cerrada, pero la zona de conjugado aún visible en el lado izquierdo del dispositivo.
65	La figura 48C	muestra el dispositivo de análisis de muestras de la figura 48A después de que se haya iniciado la prueba.

La figura 49 muestra un kit para análisis de muestras que usa un dispositivo de análisis de muestras en una realización de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para detectar un analito (también conocido como la diana) en una muestra, en donde la muestra a analizar se aplica a un portador cromatográfico. En configuraciones de múltiples planos para pruebas de diagnóstico analítico inmediato, el conjugado que contiene uno de los socios de unión del analito en cuestión es, preferiblemente, suministrado desde un plano diferente. La muestra que contiene el analito es recogida directamente de la fuente y, preferiblemente, no experimenta ningún tratamiento, elución, dilución o concentración anterior. Se hace que el conjugado entre en contacto con la muestra por medio de un compresor de muestras, también denominado en el presente documento como dispositivo compresor. La compresión ayuda a combinar el conjugado movilizado y la muestra. El compresor de muestras, que incluye el conjugado en algunas realizaciones preferidas es, preferiblemente, completamente independiente del dispositivo de análisis de muestras. El compresor de muestras no forma parte de la trayectoria de flujo sobre la tira reactiva. Como resultado, la transferencia del conjugado y la muestra al dispositivo de análisis de muestras, que es preferiblemente una tira reactiva, se inicia usando presión, no flujo o acción por capilaridad. Después de que el compresor de muestras se aplique, si fuera necesario puede haber un lapso de tiempo antes de aplicar el tampón de migración. Este lapso de tiempo entre la aplicación de muestra y el inicio de las pruebas mediante el flujo puede ser de hasta 24 horas o muchos días, dependiendo de la estabilidad del analito. Los componentes no de la tira reactiva, incluyendo, dependiendo de la realización, cualquier combinación del compresor de muestras, el colector de muestras y uno o más socios de unión externos, preferiblemente permanecen asociados con la tira reactiva hasta que se inicia el flujo.

25 En algunas realizaciones preferidas, el dispositivo de análisis de muestras incluye una zona de desvío, tal como una barrera, separación o surco que desvía el flujo a través del dispositivo de análisis de muestras hacia un plano separado. Esto aumenta la interacción entre los reactivos sobre el compresor de muestras y tanto los reactivos como la muestra sobre el dispositivo de análisis de muestras. Además, la barrera bloquea por completo el flujo hasta que el compresor de muestras se hace descender para crear un "puente" que redirige el flujo hacia el plano en el que se encuentra el compresor y entonces devuelve el flujo al dispositivo de análisis de muestras en donde finaliza la barrera. Debido a que el líquido ha de fluir a través del compresor, este recoge cualquier reactivo (incluyendo el conjugado) que esté ubicado sobre la almohadilla de compresor a medida que se desplaza.

35 Un dispositivo de flujo lateral de la presente invención puede ser un inmunoensayo que usa anticuerpos o un ensayo no inmunológico que no usa anticuerpos sino que, en su lugar, usa otros socios de unión, incluyendo, pero sin limitarse a, ácidos nucleicos, nanopartículas, ligandos y receptores.

40 Antes de una descripción adicional de la presente invención, y para que la invención se pueda entender más fácilmente, ciertos términos han sido definidos en el presente documento, tal como se relacionan con la presente invención:

45 El término "compresión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación de muestra y cualesquiera componentes sobre una almohadilla de compresor de muestras a la tira reactiva. En algunas realizaciones en las que la zona de aplicación de muestra se encuentra sobre un colector de muestras o la almohadilla de un compresor de muestras, la almohadilla, la parte de recogida del colector de muestras y la zona de aplicación de muestra son, todas, preferiblemente compresibles, de tal modo que la compresión de las tres se produce durante la aplicación de muestra a la tira reactiva.

50 El término "presión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a presión física y, más específicamente, presión física aplicada por un compresor de muestras a una muestra sobre un colector de muestras y, a su vez, a una zona de aplicación de muestra de una tira reactiva. En algunas realizaciones sin un colector de muestras, la presión se aplica entre el compresor de muestras y los componentes de la tira. Tal como se usa en el presente documento, presión, que puede ser suministrada mediante un medio mecánico o un usuario del dispositivo de flujo lateral, pone a la almohadilla de compresor de muestras, la parte de recogida del colector de muestras y la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva en contacto físico para transferir la muestra y cualesquiera componentes sobre la almohadilla de compresor de muestras a la tira reactiva. Esta transferencia, preferiblemente, no se produce mediante un flujo vertical. En otras realizaciones, la presión pone la almohadilla del compresor de muestras (que puede incluir cualquiera o la totalidad de los reactivos conjugados, los reactivos de control y/o la zona de aplicación de muestra) y la tira reactiva en contacto físico para transferir la muestra y cualquier componente sobre la almohadilla del compresor de muestras a la tira reactiva. Esta transferencia preferiblemente no tiene lugar por medio de un flujo vertical.

60 Los términos "vertical" y "en sentido vertical", tal como se usan en el presente documento, se refieren a la dirección paralela al grosor o profundidad, en oposición a las dimensiones de longitud y anchura de los elementos utilizados en el dispositivo, tales como las almohadillas o medios.

65

Los términos “lateral” y “en sentido lateral”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a la dirección paralela a la longitud, en oposición a las dimensiones de anchura y profundidad de los elementos utilizados en el dispositivo, tales como las almohadillas y los medios.

5 En algunas realizaciones, muchos de los elementos de la tira reactiva son sustancialmente planos y tienen una dimensión lateral que es mayor que la dimensión vertical. Las magnitudes de estas dimensiones unas con respecto a otras, no obstante, se pueden cambiar dentro del espíritu de la invención. En general, los términos “vertical”, “en sentido vertical”, “lateral” y “en sentido lateral” también se refieren a la yuxtaposición u orientación de los elementos del dispositivo. Para elementos yuxtapuestos en sentido vertical, una línea normal a y que interseca la superficie plana de dicho elemento es también sustancialmente normal a e interseca la superficie plana de los otros elementos yuxtapuestos en sentido vertical.

15 La expresión “trayectoria de flujo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la trayectoria del flujo por capilaridad en un dispositivo de flujo durante el uso del dispositivo. La trayectoria de flujo en un dispositivo de flujo lateral convencional es en sentido lateral a lo largo de la longitud del dispositivo. En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la trayectoria de flujo lateral se desvía hacia el compresor de muestras por medio de la zona de desvío, y entonces se desvía de vuelta sobre la tira reactiva en el extremo de la zona de desvío.

20 El término “marcador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier átomo, átomos, molécula o moléculas, tales como una marca fluorescente, usada para proporcionar una señal detectable y, preferiblemente, cuantificable. Los métodos de detección del marcador incluyen, pero sin limitarse a, detección visible, fluorescencia, quimioluminiscencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X, absorción de rayos X, magnetismo y actividad enzimática. Las zonas de prueba del espectro visible pueden ser interpretadas por un espectrómetro para dar resultados de prueba cuantificados.

25 La expresión “lisis *in situ*”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a técnicas para incorporar agentes de lisis en un dispositivo de pruebas analíticas de diagnóstico inmediato, tales como una tira reactiva de cromatografía u otro dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, de tal modo que la operación de lisis no se realice como una etapa independiente.

30 El término “zona”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier parte de la tira reactiva. Los límites de una zona son, preferiblemente, planos perpendiculares a la dirección lateral. El término “zona” también abarca el término “línea”, que se refiere a una zona que tiene una longitud en la dirección lateral significativamente menor que su anchura.

35 Los términos “encapsulación” y “microencapsulación” tal como se definen en el presente documento quieren decir envolver o encapsular de forma temporal / no permanente un reactivo o componente de un ensayo en una envolvente como si se encontrara en el interior de una cápsula. La envolvente protege el reactivo o componente frente a su entorno circundante hasta un instante apropiado. A continuación, el material escapa a través de la pared de la envolvente por diversos medios, incluyendo la rotura, disolución, fusión o difusión. En la microencapsulación, las dimensiones de la envolvente varían de una micra a varios milímetros. El término “encapsulado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un componente de ensayo o un reactivo que se haya sometido a encapsulación o microencapsulación.

45 El término “barrera” tal como se usa en el presente documento se refiere a una estructura física o barrera química que obstruye, bloquea o impide el flujo. Como alternativa, la barrera puede ser semipermeable para permitir una liberación más lenta (retardada) de otros reactivos, por ejemplo plata o reactivos de apilamiento. En algunas realizaciones, la barrera es un material inerte como Sephadex o Sepharose o acetato de celulosa. Como alternativa, la barrera puede ser de naturaleza química, por ejemplo un material higroscópico incluyendo, pero sin limitarse a, sales de calcio (por ejemplo, CaCl_2 o CaSO_4) o gel de sílice usado en desecantes. La capacidad de absorción de desecantes es limitada (y se puede controlar mediante la incorporación de diferentes cantidades) y, una vez que se ha superado el límite, el líquido se puede mover por encima (o a través) de los mismos. El hidrogel es otro ejemplo. Como alternativa, la barrera puede ser de naturaleza hidrófoba, que “repele” el tampón de migración acuoso. En los dispositivos de flujo lateral que se describen en el presente documento, la barrera bloquea el flujo en el plano lateral, forzando que el flujo se desvíe a otro plano. En algunas realizaciones preferidas, las barreras son unas membranas impermeables que interrumpen el flujo en el mismo plano. En otras realizaciones preferidas, la barrera que impide el flujo es “semipermeable”, dando lugar a dos flujos que difieren en los caudales. La trayectoria de flujo más lento puede proporcionar nuevos reactivos de una forma retardada en el tiempo.

60 Los términos “separación” o surco” tal como se usan en el presente documento se refieren a una abertura, fisura u orificio que obstruye, bloquea o impide el flujo. En los dispositivos de flujo lateral que se describen en el presente documento, la separación o surco detiene el flujo en el plano lateral, forzando que el flujo se desvíe a otro plano. La profundidad de la separación o surco es cualquier profundidad suficiente para detener o bloquear por completo el flujo.

65

5 Algunas realizaciones de la presente invención incluyen ensayos en los que el analito (diana) a detectar no se une directamente a un socio de unión inmovilizado en la zona de prueba de una tira reactiva. En su lugar, el analito preferiblemente interactúa con uno o más socios de unión al analito en otras zonas (o en el tampón, en algunas realizaciones) sobre la tira. Al menos uno de los socios de unión al analito incluye una primera marca que forma un complejo con una segunda marca inmovilizada en la zona de prueba. En otras realizaciones, el analito se une directamente a un socio de unión inmovilizado en la zona de prueba de la tira reactiva.

10 En algunas realizaciones preferidas, un socio de unión a la zona de control está incluido sobre el compresor de muestras. Con este diseño, si la zona del conjugado sobre el compresor de muestras no está adecuadamente comprimida y se le ha hecho contactar con la tira reactiva, no se desarrollará ninguna zona de control incluso con un flujo apropiado del tampón de migración. Por lo tanto, el aspecto de la zona de control con las muestras de prueba tanto negativa como positiva indica un auténtico control procedimental en la prueba.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, cuando comienza el flujo lateral, la tira reactiva ya no se encuentra en contacto compresivo con el compresor de muestras y el colector de muestras. En otras realizaciones de la presente invención, no obstante, la pila vertical se mantiene durante el flujo lateral para aumentar al máximo la transferencia desde el compresor de muestras y el colector de muestras a la tira reactiva. En otras realizaciones más, el colector de muestras se retira de la pila vertical después de la aplicación de muestra a la tira reactiva, pero el compresor de muestras se mantiene a continuación en contacto con la tira reactiva durante el flujo lateral para aumentar al máximo la transferencia desde el compresor de muestras a la tira reactiva. En algunas realizaciones con una zona de desvío, la tira reactiva se encuentra en contacto de compresión con el compresor de muestras cuando comienza el flujo lateral, y el compresor de muestras crea un puente por encima de la zona de desvío.

20 La invención proporciona un método sensible y rápido para la detección de analitos, por ejemplo patógenos, enzimas, mediadores inmunológicos, ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lipopolisacáridos, productos de adición de proteínas, marcadores tumorales y cardíacos y/o compuestos de bajo peso molecular, incluyendo, pero sin limitarse a, haptenos. Los métodos y dispositivos son adecuados para el diagnóstico en seres humanos y animales, por ejemplo mascotas o animales de granja. La detección puede incluir detección directa del analito y/o la detección de anticuerpos contra el analito, que se encuentran presentes en la muestra de fluido a poner a prueba. Preferiblemente, el método incluye una determinación paralela de una pluralidad de analitos. Los patógenos se seleccionan, preferiblemente, entre virus o microorganismos, tales como bacterias, hongos (por ejemplo, levaduras o mohos) o parásitos (por ejemplo, amebas o nematodos). Los mediadores inmunitarios son parte de la cascada inflamatoria e incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos, factores de crecimiento, complementos, citoquinas, linfoquinas, quimioquinas, interferones y derivados de interferón, proteína C-reativa, calcitonina, amiloide, moléculas de adhesión, anticuerpos, y componentes quimio-atrayentes. Los compuestos de bajo peso molecular pueden incluir moléculas de fármacos o químicas o complejos y metabolitos formados por moléculas de fármacos o químicas.

25 La detección puede incluir una detección directa de la diana, por ejemplo el patógeno, y/o la detección de anticuerpos contra la diana, por ejemplo el patógeno, que se encuentran presentes en la muestra de fluido a poner a prueba. Preferiblemente, el método incluye una determinación paralela de una pluralidad de dianas.

30 Como alternativa, el analito de interés puede ser un compuesto de bajo peso molecular. En una realización preferida, el analito a detectar es una molécula de fármaco tal como heroína o metanfetamina. En otras realizaciones preferidas, el compuesto de bajo peso molecular es una molécula pequeña, tal como un hapteno.

35 La invención también incluye la detección de una pluralidad de patógenos, alérgenos, mediadores inmunitarios, ácidos nucleicos o compuestos de bajo peso molecular sobre un único portador cromatográfico. El dispositivo de análisis de muestras puede permitir la detección simultánea de una pluralidad de compuestos de bajo peso molecular, mediadores inmunitarios, ácidos nucleicos, proteínas o patógenos. A pesar de que la muestra es, preferiblemente, un fluido, materia o masa seca parcial o sustancialmente sólida se puede poner a prueba como una muestra en dispositivos y métodos de la presente invención. Por ejemplo, el fluido se puede coagular o endurecer, tal como en una herida cicatrizante, ser recogido con el colector de muestras, y a continuación transferido a la zona de aplicación de muestra. La muestra puede ser, como alternativa, una parte endurecida de una ampolla eliminada de la ampolla que puede estar humedecida por un fluido corporal cerca del sitio de la ampolla, tal como cuando se recoge una muestra a poner a prueba para una enfermedad de transmisión sexual, o humedecerse mediante el tampón de flujo sobre la tira reactiva. La muestra puede ser uno o más exudados de heridas o ampollas.

40 La muestra corporal es, preferiblemente, sangre completa, suero, plasma, un fluido de membrana mucosa (de las cavidades bucal, nasal, vaginal, anal, del oído interno y ocular), líquido cefalorraquídeo (LCR), fluido lacrimal, fluido del pene, una secreción o exudado de una glándula, o una secreción o exudado de una lesión o ampolla, por ejemplo lesiones o ampollas sobre la piel. Más preferiblemente, la muestra se selecciona entre fluidos bucal, nasal, ocular, genital y rectal y secreciones o exudados de lesiones o ampollas de la piel.

65 En algunas realizaciones, la cantidad de líquido asociado con la muestra es insuficiente para transferir la muestra y/o cualquier conjugado o segundo socio de unión sobre la almohadilla de compresor de muestras a la zona de

- 5 aplicación de muestra bajo compresión; en su lugar, el tampón de migración proporciona el fluido adicional requerido para la transferencia de la muestra y/o conjugado y/o segundo socio de unión a la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva. En otras realizaciones, la muestra y/o cualquier conjugado o segundo socio de unión sobre la almohadilla de compresor de muestras es transferido a la zona de aplicación de muestra bajo compresión. En algunas realizaciones alternativas, el tampón de migración se puede aplicar a través del compresor. En algunas realizaciones con una zona de desvío, el tampón de migración recoge los componentes sobre el compresor de muestras (incluyendo reactivos conjugados, reactivos de control y la muestra) y un colector de muestras, si se encuentra presente, cuando este se desvía hacia el compresor de muestras.
- 10 En algunas realizaciones preferidas, la muestra es un fluido que no gotea o fluye después de que es recogido. En su lugar, el fluido es una masa coagulada, de tal modo que, después de que la muestra está recogida sobre el colector de muestras, la muestra se pueda mantener en sentido vertical o incluso boca abajo, y la muestra permanece sobre el colector de muestras. Por ejemplo, cuando una muestra ocular es recogida y no está sometida a pretratamiento, la muestra permanece sobre el colector de muestras incluso si se mantiene en sentido vertical o boca abajo,
- 15 principalmente debido a la tensión superficial. Esto se debe a que la muestra está atrapada y contenida eficazmente sobre el colector de muestras material, por ejemplo una superficie afelpada del colector de muestras. En algunas realizaciones preferidas, se usan fibras de poli(tereftalato de etileno) (PET), tales como fibras Dacron®, o fibras de nailon, debido a que la unión no es específica o permanente, así que estas fibras "liberan" el analito cuando se humedecen. El fenómeno es similar a limpiar suavemente una salpicadura con una toalla de papel, de tal modo que
- 20 la humedad se mantiene en los poros y mediante la tensión superficial. Otros materiales que se podrían usar para la superficie afelpada del colector de muestras incluyen, pero sin limitarse a, poliésteres, celulosa, rayón, alginato cálcico, estructuras mecánicas sometidas a microingeniería que contienen microcapilares y/o microcanales, u otras telas o mallas. En algunas realizaciones en las que se necesita un material colector estéril para recoger un fluido del cuerpo humano, se usan preferiblemente materiales que pueden ser esterilizados y están aprobados para
- 25 biocompatibilidad.
- Una ventaja significativa del método es que los resultados de la prueba se proporcionan dentro del periodo de consulta médica, por ejemplo en unos pocos minutos. Preferiblemente, los resultados se proporcionan en un periodo de tiempo de hasta 20 minutos, más preferiblemente hasta 15 minutos. La prueba también se puede realizar hasta
- 30 de 24 a 48 horas después de que la muestra ha sido tomada del paciente. Además, debido a que la prueba es no invasiva, plantea muy poco riesgo para el paciente. Por lo tanto, el mejor tratamiento disponible se puede aplicar de forma oportuna para un patógeno específico. Una ventaja adicional respecto a métodos de la técnica anterior es que solo se requieren unos pocos microlitros de muestra para realizar un análisis. La muestra es, preferiblemente, de aproximadamente 0,1 microlitros a aproximadamente 100 microlitros, más preferiblemente de aproximadamente 0,2
- 35 microlitros a aproximadamente 20 microlitros y, de la forma más preferible, de aproximadamente 0,5 microlitros a aproximadamente 15 microlitros.
- La invención se puede realizar por medio de un sencillo kit de prueba. La manipulación del kit de prueba no necesita equipo de laboratorio adicional, manipulación adicional de reactivos o instrumentación. Otra importante ventaja de la invención que se describe en el presente documento es que el límite de detección es, normalmente, de 10 a 100
- 40 veces inferior que las pruebas de diagnóstico disponibles actualmente, debido a que las muestras no requieren dilución antes de ser transferidas al dispositivo de análisis. Por lo tanto, los métodos de la presente invención son más sensibles y precisos que los métodos de la técnica anterior.
- 45 Si tanto el conjugado, que incluye un primer socio de unión para el analito y un marcador detectable, como un segundo socio de unión para el analito están ubicados sobre el compresor de muestras, el dispositivo de análisis de muestras se puede fabricar y usar para pruebas para cualquier analito. El usuario necesitaría simplemente elegir el compresor específico que contenía los socios de unión dirigidos al analito de interés.
- 50 En algunas de las realizaciones de la invención, una muestra de fluido corporal se recoge de forma no invasiva con un dispositivo de recogida o elemento de hisopo. La etapa de recogida preferiblemente incluye pasar o restregar el elemento de hisopo sobre una superficie del cuerpo que contiene fluido corporal a poner a prueba. Preferiblemente, el elemento de hisopo es estéril. El elemento de hisopo puede estar seco o pretratado con un fluido antes de la etapa de recogida.
- 55 En otras realizaciones, la muestra de fluido corporal, tal como sangre, se recoge en una pipeta u otro dispositivo de recogida. La etapa de recogida preferiblemente incluye la obtención de sangre, por ejemplo usando una lanceta, y recogiendo la misma con una pipeta.
- 60 En algunas realizaciones preferidas, no hay pretratamiento del elemento de hisopo o la sangre en la pipeta, y la muestra se recoge y se transfiere al dispositivo de análisis de muestras sin ningún tratamiento de la muestra recogida. Recogiendo la muestra con un dispositivo de recogida y no sometiendo a la muestra a etapas de pretratamiento tales como extraer y/o diluir la muestra, se evita la degradación de la muestra. El analito a poner a prueba, preferiblemente, permanece intacto o en su forma nativa rodeado por o mezclado con las otras sustancias
- 65 de origen natural en la muestra.

En la técnica anterior, cuando la muestra se extrae y se diluye en tampón, la muestra a menudo ya no está intacta. Esto puede cambiar la "conformación" del analito debido a su estabilidad o labilidad. Recogiendo una muestra directamente usando un dispositivo de recogida y no pretratando la muestra, la naturaleza nativa de la muestra se preserva en forma concentrada. Debido a que esto da como resultado una mayor concentración de muestra en menos volumen, esto incrementa la sensibilidad de la prueba. Además, sin dilución de la muestra, el tiempo de aparición y la intensidad de la zona de prueba son directamente proporcionales a la concentración de analito. Usando un espectrómetro, es posible obtener cuantificación numérica absoluta. Además, el no tener que pretratar la muestra hace a la prueba más sencilla, más rápida y menos costosa. También permite que la prueba sea realizada en un entorno clínico por médicos, enfermeros, o técnicos de laboratorio. En tiras reactivas usadas para detectar conjuntivitis, la sensibilidad de las pruebas es comparable a la sensibilidad de pruebas de reacción en cadena de polimerasa ultrasensibles.

Los métodos y dispositivos de la técnica anterior requerían pretratamiento. Algunas de las razones por las que se creía que el pretratamiento era necesario incluían la creencia errónea de que el pretratamiento daría como resultado una muestra más homogénea. Otra razón era que se creía que era necesario tamponar las muestras concentradas antes de llevar a cabo un ensayo de unión. Otros describieron la necesidad de lavar la muestra, eliminar partículas y sustancias contaminantes que podrían dar lugar potencialmente a una reacción de unión inespecífica y, por lo tanto, un resultado de la prueba falso positivo. También había una creencia generalizada en la técnica anterior de que una muestra homogénea más grande producía los resultados de la prueba de ensayo más sensibles y específicos.

Por el contrario, al no pretratar la muestra, el usuario conserva muestras no homogéneas, altamente concentradas. Tal como se describe mediante el principio material de la polarización interfacial, en materiales dieléctricos no homogéneos hay distribuciones de carga que se producen en las interfaces de las fases que componen el dieléctrico no homogéneo. En una muestra de fluido corporal infeccioso "intacta" (sin diluir o sin alterar) *in vivo*, las cargas o los portadores de carga están impedidos mediante captura en centros de impureza o en las interfaces de fase. Las características de esta muestra "intacta" dan como resultado un efecto condensador de dos capas que da como resultado una polarización de espacio - carga. Las características de una naturaleza homogénea "intacta" dan como resultado una mayor eficiencia de unión y, por lo tanto, un ensayo más sensible.

Anteriormente se desconocía qué efectos tendrían los fluidos corporales, incluyendo sangre, lágrimas y exudados purulentos, sobre diferentes materiales de superficie afelpada del colector. Específicamente, se desconocía si los analitos serían liberados eficazmente del otro material celular y transferidos desde un colector de muestras a un dispositivo de análisis de muestras.

En algunas realizaciones, el tamaño de muestra es, preferiblemente, unos pocos microlitros. Después de la transferencia de la muestra a la zona de aplicación de muestra (preferiblemente sin tratar la muestra), se añade el medio de elución (también conocido como tampón de migración). Los métodos de la técnica anterior de ejecución de inmunoensayos de flujo lateral eran incapaces de realizar esta etapa de lavado. Por ejemplo, cuando se recoge una muestra ocular para realizar pruebas de infecciones oculares, tales como conjuntivitis, el tamaño de muestra es, preferiblemente, de 3 a 15 microlitros. En este ejemplo, de 150 a 200 microlitros de medio de elución se añaden a continuación a la tira reactiva. Como comparación con diferentes sistemas de ensayo, este lavado de 40 a 50 veces supera el lavado realizado en pruebas de ELISA dependientes de máquinas.

En un ejemplo de recogida de una muestra, usando un suave movimiento en remolino, un elemento de hisopo estéril se puede aplicar a la superficie corporal o membrana mucosa de importancia y se le permite capturar cualesquiera patógenos, compuestos de bajo peso molecular y/o mediadores inmunitarios, péptidos, glucoproteínas, ácidos nucleicos y componentes relacionados con alergias contenidos en el fluido corporal.

El elemento de hisopo puede ser una parte que es dependiente del dispositivo de análisis de muestras. La muestra es, a continuación, transferida poniendo el contacto el elemento de hisopo con el dispositivo de análisis de muestras y el compresor de muestras en condiciones, en donde al menos parte de la muestra se encuentra sobre el elemento de hisopo. Al menos parte del conjugado en algunas realizaciones en las que el conjugado está ubicado sobre el compresor de muestras y/o al menos parte del segundo socio de unión en algunas realizaciones en las que el segundo socio de unión está ubicado sobre el compresor de muestras son también transferidas al dispositivo de análisis de muestras debido a la presión. Esto es un fenómeno similar a exprimir el fluido fuera de una esponja. En la presente realización, el elemento de hisopo, preferiblemente, se encuentra en contacto tanto con una zona de aplicación de muestra sobre el dispositivo de análisis como sobre la parte de almohadilla de compresor de muestras (que preferiblemente incluye el conjugado y/o un segundo socio de unión para el analito). La muestra y el conjugado son, a continuación, transferidos a la zona de aplicación de muestra y, a continuación, se desplazan a la zona de detección. En algunas realizaciones, el elemento de hisopo puede estar fijado en una posición de contacto con el dispositivo de análisis de muestras en el que la zona de recogida de muestras del elemento de hisopo se encuentra en contacto directo con la zona de aplicación de muestra del dispositivo de análisis. Por lo tanto, el elemento de hisopo y/o el dispositivo de análisis, preferiblemente, incluyen medios de fijación para proporcionar un contacto fijado entre ambas partes en una posición predeterminada. Como alternativa, el elemento de hisopo puede ser una parte integrante del dispositivo de análisis de muestras y la transferencia incluye hacer pasar al menos una parte de la muestra sobre el elemento de hisopo, así como el conjugado, a la zona de aplicación de muestra ejerciendo presión

usando el compresor de muestras. En algunas realizaciones, el compresor de muestras es también una parte integrante de un dispositivo de análisis de muestras integrado y está, preferiblemente, conectado al dispositivo mediante una bisagra. En otras realizaciones, el compresor de muestras es independiente del resto del dispositivo.

5 La transferencia de la muestra desde el elemento de hisopo a la zona de aplicación de muestra sobre el dispositivo de análisis de muestras es, preferiblemente, una transferencia directa, es decir la transferencia tiene lugar sin pretratamiento de la muestra sobre el elemento de hisopo. En algunas realizaciones sin pretratamiento de la muestra o el elemento de hisopo, la microfiltración se produce en la región en la que la superficie afelpada del elemento de hisopo contacta directamente con la superficie afelpada sobre la tira. Las fibras de la superficie afelpada se
10 entrelazan para formar una red o interferencia física. Por lo tanto, elementos más grandes contenidos en la muestra son retenidos y no se eluyen sobre el dispositivo de análisis de muestras. A medida que el conjugado y la muestra se mueven a través de la zona de aplicación de muestra, los analitos más pequeños se eluyen. Además, cuando se usan muestras de fluidos de membrana mucosa, la alteración mecánica de la mucosa en fluidos corporales de la membrana mucosa purifica la muestra y el analito de interés.

15 En otras realizaciones, la transferencia incluye una elución de la muestra a partir del elemento de hisopo con un medio de elución, por ejemplo un tampón o agua. El medio de elución se puede añadir desde una fuente externa o se puede proporcionar, por ejemplo como un depósito, dentro del dispositivo de análisis. Además, la transferencia es, preferiblemente, una transferencia cromatográfica y/o por capilaridad de fluido a la zona de detección sobre el dispositivo de análisis de muestras.
20

En otras realizaciones, una muestra de fluido corporal, tal como sangre, se recoge en una pipeta u otro dispositivo de recogida. La etapa de recogida preferiblemente incluye la obtención de sangre, por ejemplo usando una lanceta, y recogiendo la misma con una pipeta. La sangre se transfiere entonces directamente sobre el dispositivo de análisis de muestras. En la presente realización, la sangre se transfiere preferiblemente a la almohadilla de compresor de muestras, o aguas arriba o aguas abajo de la zona de desvío sobre la tira reactiva.
25

En algunas realizaciones preferidas con un elemento de hisopo, el elemento de hisopo está colocado entre una tira reactiva de flujo lateral y una parte de almohadilla de compresor de muestras (que puede incluir el conjugado que incluye un primer socio de unión para el analito y un marcador detectable, un segundo socio de unión para el analito que incluye una marca, un socio de unión a la zona de control, o cualquier combinación de cualquiera de estos). Con esta etapa, la muestra recogida es transferida directamente sobre una tira reactiva. La tira reactiva, preferiblemente, incluye una o varias superficies afelpadas o membranas activas por capilaridad.
30

En algunas realizaciones preferidas, la muestra se añade a una tira reactiva cromatográfica, y el conjugado se añade como una etapa independiente después de que la muestra es añadida. En las presentes realizaciones, el conjugado y la muestra no se añaden simultáneamente. Por ejemplo, un colector de muestras que incluye la muestra se coloca sobre una zona de aplicación de muestra de una tira reactiva. Al menos parte de la muestra es transferida a la tira reactiva en este momento. A continuación, se añade el compresor de muestras que contiene el conjugado y el compresor de muestras comprime al colector de muestras. Esto facilita la transferencia adicional de la muestra, así como la transferencia del conjugado, sobre la tira reactiva. Si se encuentra presente el analito, un complejo entre el analito en la muestra y el conjugado se puede formar en cuanto el conjugado comienza a comprimir la muestra. Con muestras de fluido, el complejo comienza a formarse debido a la naturaleza fluida de la propia muestra. En algunas realizaciones preferidas, el segundo socio de unión para el analito está también sobre el compresor de muestras o en la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva. En las presentes realizaciones, el sándwich completo entre el primer socio de unión, el analito y el segundo socio de unión se puede formar antes de que se añada si quiera el tampón. La adición del tampón intensifica adicionalmente la formación del complejo y, a continuación, el transporte de los componentes a la zona de detección. Debido a que el complejo se puede formar durante la compresión, puede haber un desfase entre el muestreo y las pruebas. La reacción entre el analito y el conjugado comienza, preferiblemente, antes de que se añada el tampón a la tira reactiva. El desfase entre cuando se añaden la muestra y el conjugado y cuando se añade el tampón puede ser de hasta 24 horas o incluso mayor.
35
40
45
50

El proceso de detección se iniciará directamente con la transferencia de la muestra o puede requerir un medio de elución a aplicar para análisis de la muestra. En algunas realizaciones, el medio de elución es simple agua corriente. En otras realizaciones, el medio de elución es una solución tampón alcalina. En el caso de una tira reactiva inmunoquímica en la que la zona de detección se encuentra en sentido lateral aguas abajo de la zona de aplicación de muestra, el medio de elución seleccionado se mueve hacia una zona de detección y, de este modo, pasa el sitio de contacto dentro del dispositivo de recogida. El analito y el conjugado son eluidos por el medio de elución y son llevados con él a la zona de detección. En la zona de detección, el analito se determina mediante métodos cualitativos y/o cuantitativos, por ejemplo en una reacción de unión inmunológica.
55
60

La tira reactiva puede estar hecha de un único material cromatográfico o, preferiblemente, varios materiales activos por capilaridad hechos de los mismos o diferentes materiales y fijados sobre un sustrato de soporte. Estos materiales se encuentran en contacto estrecho entre sí para formar una trayectoria de transporte a lo largo de la cual un líquido impulsado por fuerzas de capilaridad fluye desde la zona de partida, pasando el sitio de contacto del hisopo y la zona de detección, hacia una zona de desechos en el otro extremo de la tira.
65

Algunos materiales y membranas preferidas para la tira reactiva incluyen, pero sin limitarse a, fibras de poli(tereftalato de etileno) (PET), tales como fibras Dacron®, nitrocelulosa, poliéster, nailon, acetato de celulosa, hidrogel, polipropileno, fibras de vidrio y combinaciones de estos materiales y sus sustratos. Las características de las superficies afelpadas y membranas dependen de los tipos de materiales usados para una región o zona particular de la tira reactiva o el dispositivo de recogida. Tal como se describe en el presente documento, los materiales que permiten que los reactivos (incluyendo aquellos en la zona de reactivo, la zona de captura o cualquiera de las otras zonas que se describen en el presente documento) sean móviles y se desplacen con el medio de elución incluyen materiales o fibras de superficie afelpada, en los que la unión no es específica o permanente, de tal modo que el analito y los reactivos pueden ser liberados cuando se encuentran con el medio de elución o con un gran volumen de muestra. Algunos de estos materiales incluyen, pero sin limitarse a, fibras de poli(tereftalato de etileno) (PET), tales como fibras Dacron®, fibras de nailon, fibras de poliéster, fibras de acetato de celulosa, fibras de polipropileno, fibras de vidrio, espuma, esponjas, y otras telas y mallas. En contraste, los materiales que inmovilizan reactivos en una zona particular (incluyendo, por ejemplo, los reactivos inmovilizados sobre la zona de prueba y la zona de control de la zona de detección y los reactivos de captura en las realizaciones, que incluyen reactivos de captura inmovilizados en una zona de captura aguas abajo de la zona de aplicación de muestra) incluyen, pero sin limitarse a, fibras de nitrocelulosa y nailon tratadas químicamente, de tal modo que fibras individuales en la malla de nailon se unen permanentemente a reactivos tales como proteínas. Algunos métodos para fabricar diferentes partes de la tira incluyen, pero sin limitarse a, rallar, pulverizar, empapar, y secar materiales sobre la tira.

A pesar de que se usa nitrocelulosa para la zona de detección en muchas de las realizaciones de la presente invención, en otras realizaciones, se pueden usar membranas neutras, tales como de nailon o poliéster. En las presentes realizaciones, proteínas, tales como neutravidina, anticuerpos y antígenos, nanopartículas o ácidos nucleicos no se inmovilizan directamente. En su lugar se conjugan a microesferas que se “depositan” en el interior de la membrana y se mantienen en las grietas.

Algunos materiales preferidos para la parte de almohadilla de compresor de muestras incluyen, pero sin limitarse a, fibras de poli(tereftalato de etileno) (PET), tales como fibras Dacron®, fibras de nailon, fibras de poliéster, fibras de acetato de celulosa, fibras de polipropileno, fibras de vidrio, una superficie afelpada, espuma, esponjas, y otras telas y mallas.

Los materiales de la tira reactiva preferiblemente filtran y/o retienen materia particulada, así como restos celulares, los precipitados, etc., en las membranas. Además, debido a que el volumen de la muestra es, preferiblemente, tan pequeño, la muestra permanece situada en los materiales y el tampón de elución, que fluye directamente por debajo de la muestra, contacta con y transporta la muestra de tal modo que la muestra se pueda extraer, lisar y/o filtrar antes de que alcance la zona de prueba de la zona de detección.

Además, los dispositivos y kits de prueba de la presente invención preferiblemente realizan los métodos que se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones preferidas, el conjugado está ubicado sobre un compresor de muestras, independiente del dispositivo de análisis de muestras. El conjugado, preferiblemente, incluye un primer socio de unión para el analito, así como estar marcado con un marcador detectable. El marcador es, preferiblemente, detectable de forma visible y/o por fluorescencia, pero se puede usar cualquier forma de detección conocida en la técnica, dependiendo del marcador seleccionado. En algunas realizaciones preferidas con una zona de desvío, la muestra se aplica al compresor de muestras en una ubicación que preferiblemente se solapa con el conjugado.

En algunas realizaciones, el marcador detectable para el conjugado puede ser oro coloidal, perlas de látex coloreadas, nanopartículas fluorescentes, nanopartículas quimioluminiscentes, nanopartículas paramagnéticas o nanopartículas fosforescentes.

Se realiza interpretación cualitativa visualmente observando la intensidad y tonalidad de la zona de prueba. En un ejemplo en el que se usa un colorante rojo visual como marcador, cuando la concentración del analito es igual o está ligeramente por encima del límite inferior de detección, la zona de prueba se puede ver débilmente y la tonalidad es rosa. A medida que la concentración del analito se incrementa, la intensidad de la zona de prueba se incrementa de forma correspondiente y la tonalidad cambia de rosa a rojo brillante. Se desarrolla una interpretación cuantitativa usando un espectrómetro que funciona en el espectro visible. Se puede usar una medición de la absorción o una medición de reflectancia en el espectro visible para desarrollar la cuantificación de la zona de prueba. En primer lugar, se desarrollan un conjunto de concentraciones caracterizadas del analito. Cada una de las concentraciones se aplica a la zona de aplicación de muestra y se realiza la prueba. El espectrómetro se usa para medir la absorción o la reflectancia de la zona de prueba. Se calcula una curva patrón a partir de los valores medidos del espectrómetro. La curva patrón es normalmente lineal. En otras realizaciones, si se usan marcas fluorescentes, se puede desarrollar un conjunto similar de concentraciones del analito conocidas. Una concentración desconocida del analito puesto a prueba y cuantificado por el espectrómetro proporciona un valor que, cuando se representa gráficamente en la curva patrón, se puede correlacionar con una concentración de analito.

5 El marcador visual puede ser cualquier marcador visible a simple vista, incluyendo, pero sin limitarse a, partículas coloreadas tales como oro coloidal, perlas de látex teñidas, selenio o carbono. En algunas realizaciones, las marcas visuales también están revestidas con elementos que exhiben fluorescencia. En algunas realizaciones, el elemento que exhibe fluorescencia es un colorante que exhibe fluorescencia. Como alternativa, una mezcla de, preferiblemente, conjugados de perlas de látex que exhiben fluorescencia incoloras se mezcla con conjugados de oro coloidal (un espectro visible), o conjugados que producen una zona de prueba de lectura visible, en inmunoensayos de flujo lateral para potenciar la sensibilidad del ensayo y para ayudar a leer visualmente auténticos positivos y auténticos negativos. En algunas realizaciones en las que se usan nanopartículas, las nanopartículas que se pueden usar incluyen, pero sin limitarse a, selenio, carbono y oro coloidal.

10 En algunas realizaciones, un segundo socio de unión para el analito también está ubicado sobre el compresor de muestras. El segundo socio de unión incluye una marca pero no un marcador detectable. El segundo socio de unión puede estar, como alternativa, ubicado en la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, o en cualquier ubicación sobre la tira reactiva entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección. En algunas realizaciones en las que hay un segundo socio de unión para el analito aguas abajo de la zona de detección o sobre el compresor de muestras, la zona de detección incluye una marca inmóvil que se une a la parte de marca del segundo socio de unión.

15 En una realización preferida, el segundo socio de unión está marcado con biotina. En algunas realizaciones en las que la marca sobre el segundo socio de unión es biotina, la marca inmovilizada en la zona de detección es, preferiblemente, avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión está marcado con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada en la zona de detección es, preferiblemente, biotina. Como alternativa, la marca sobre el segundo socio de unión puede ser una lectina y la marca inmovilizada puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos.

20 En una realización preferida, los socios de unión específicos para los analitos en la zona del conjugado sobre el compresor de muestras y/o en la zona de aplicación de muestra son anticuerpos monoclonales, policlonales, o recombinantes o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a un patógeno. En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra un patógeno, un mediador inmunitario, péptidos, glucoproteínas o un alérgeno. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. Los métodos y dispositivos de la presente invención se pueden usar para cualesquiera ensayos de unión, y pueden evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

25 En la totalidad de las presentes realizaciones, un "sándwich" completo se crea, preferiblemente, entre el primer socio de unión del conjugado, el analito y el segundo socio de unión, en la zona de aplicación de muestra cuando el analito se encuentra presente. Como alternativa, el "sándwich" completo se puede formar entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección, si cualquiera del primer socio de unión o el segundo socio de unión está ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de muestra. El sándwich completo se desplaza a continuación a la zona de detección, en la que la marca sobre el segundo socio de unión se une a la marca inmovilizada en la zona de detección. Nótese que el complejo entre la marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada en la zona de detección se produce independientemente de si el analito está o no presente. No obstante, el complejo solo es detectable cuando el analito se encuentra presente y el conjugado (que incluye un marcador detectable) se ha unido al analito.

30 En otras realizaciones, en lugar de tener un segundo socio de unión para el analito sobre el compresor de muestras o sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección, un segundo socio de unión para el analito inmovilizado está ubicado en la zona de detección. En las presentes realizaciones, la mitad del "sándwich" se forma entre el primer socio de unión del conjugado y el analito, que a continuación se desplaza hasta la zona de prueba, en la que el medio sándwich se une al segundo socio de unión inmovilizado, completando el "sándwich" completo.

35 El dispositivo preferiblemente también incluye una zona de control, que indica si la prueba se ejecutó correctamente. En algunas realizaciones preferidas, un socio de unión a la zona de control, por ejemplo un socio de unión a la zona de control móvil con un marcador visual, también está ubicado sobre el compresor de muestras. La colocación del socio de unión a la zona de control móvil, que se une a un socio de unión inmovilizado en la zona de control, sobre el compresor de muestras indicará si se produjo o no la transferencia del conjugado desde el compresor de muestras a la zona de aplicación de muestra del dispositivo de análisis de muestras. Éste es un control muy útil, debido a que es esencial que el conjugado sea transferido para detectar la presencia del analito.

40 La muestra se puede tomar mediante un elemento de hisopo convencional, tal como se usa actualmente en la consulta del médico o salas de urgencias. Este elemento de hisopo es presionado posteriormente en el interior de la

45

50

55

60

65

zona de aplicación de muestra de la tira reactiva cromatográfica usando el compresor de muestras.

En algunas realizaciones preferidas, en lugar de lisar células “fuera” de un dispositivo de pruebas analíticas de diagnóstico inmediato, la presente invención utiliza “lisis *in situ*”. En las presentes realizaciones, los métodos y dispositivos de la presente invención incorporan una zona de lisis que incluye al menos un agente de lisis como parte de una tira reactiva de ensayo de flujo lateral, tal como las que se describen en el presente documento, u otros dispositivos de ensayo de flujo lateral conocidos en la técnica, para lisar el material de la muestra *in situ*. Además, una zona de captura captura sustancias interferentes para incrementar la precisión del ensayo.

Después de la carga de la muestra, la muestra que se desplaza con el líquido de transporte se encuentra con el agente de lisis. El agente de lisis habrá sido cargado previamente sobre la tira reactiva y es eluido por el líquido de transporte. En algunas realizaciones preferidas, el agente de lisis ha sido secado en la tira reactiva. Como alternativa, el agente de lisis puede ser secado previamente mediante secado por congelación o liofilización y a continuación cargado previamente en la tira reactiva. En otras realizaciones, el agente de lisis puede estar absorbido, adsorbido, embebido o atrapado en la tira reactiva. En una realización preferida, el agente de lisis está situado sobre la zona de aplicación de muestra o aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, de tal modo que la muestra se lisa cuando es transferida al dispositivo de análisis de muestras. El agente de lisis es, preferiblemente, soluble o miscible en el líquido de transporte de la muestra, y el agente de lisis se disuelve y se activa en el momento del contacto con el líquido de transporte de la muestra. El líquido de transporte de la muestra contiene entonces tanto agente de lisis en solución o suspensión como componentes de la muestra en suspensión. Cualesquiera componentes susceptibles a lisis en la muestra, en el momento de ser expuestos en suspensión al agente de lisis, son a su vez lisados *in situ*. El analito es, preferiblemente, expuesto a continuación tanto al conjugado marcado como al segundo socio de unión, para formar el sándwich antes de alcanzar la zona de detección. Como alternativa, el agente de lisis puede estar incluido en el tampón de migración.

Como alternativa, el agente de lisis se puede introducir en la tira reactiva durante una etapa de compresión de la muestra. En una realización, el agente de lisis está ubicado sobre la almohadilla de compresor de muestras. Como alternativa, el agente de lisis se puede secar sobre el elemento de hisopo del colector de muestras si no es necesario que el elemento de hisopo sea estéril. En caso contrario, el elemento de hisopo se puede esterilizar después de la adición del agente de lisis usando técnicas de esterilización que no dañen la capacidad de lisado del agente de lisis.

La concentración de agente de lisis cargado previamente sobre una tira reactiva está, preferiblemente, entre el 0,001 % y el 5 % en peso / volumen. El volumen a cargar previamente depende de dónde se cargue previamente el agente de lisis. Son intervalos apropiados de 1 a 10 microlitros cuando se carga previamente en la superficie afelpada del colector de muestras (la zona de aplicación de muestra) o de 5 a 50 microlitros cuando se carga previamente en la almohadilla absorbente o en otras ubicaciones dentro de la tira reactiva. Idealmente, la cantidad cargada previamente ha de ser de aproximadamente 3 microlitros cargados previamente en la superficie afelpada del colector de muestras o aproximadamente 10 microlitros cargados previamente en la almohadilla absorbente o en otras ubicaciones dentro de la tira reactiva.

La selección de un entorno y agente de lisado específicos dependerá del analito y el ensayo. El pH y la fuerza iónica son claves para el entorno de lisado. En lo que respecta al pH establecido por el agente de lisis, un pH por debajo de 4,0 tiende a precipitar materiales, especialmente proteínas. Un pH más elevado, por encima de aproximadamente 10,0, tiende a lisar materiales tales como proteínas y paredes celulares. Por lo tanto, un pH de aproximadamente 10,0 o superior es preferible para muchas aplicaciones. Como alternativa, se puede preferir un pH inferior para dianas de ácido nucleico.

En lo que respecta a la fuerza iónica establecido por el agente de lisis, se puede usar una fuerza iónica tanto elevada como baja para lisar. Por ejemplo, una fuerza iónica baja (hipotónica) tiende a romper eritrocitos. El agua por sí misma puede lisar eritrocitos. Entornos de fuerza iónica más elevada se pueden usar para romper ciertas paredes y membranas celulares.

En lo que respecta a agentes de lisis específicos, se pueden agrupar y seleccionar basándose en sus propiedades: sales, agentes anfóteros y catiónicos, y detergentes iónicos y no iónicos. El cloruro de amonio (NH₄Cl) lisa eritrocitos. Otras sales, incluyendo, pero sin limitarse a, elevadas concentraciones de cloruro sódico (NaCl) y cloruro potásico (KCl), pueden romper ciertas paredes y membranas celulares. Otros agentes de lisis son agentes anfóteros incluyendo, pero sin limitarse a, Lyso PC, CHAPS y Zwittergent. Como alternativa, se pueden usar agentes catiónicos incluyendo, pero sin limitarse a, C16 TAB y cloruro de benzalconio como agente de lisis. Detergentes tanto iónicos como no iónicos se usan a menudo para romper o lisar los componentes de la pared celular o la membrana celular, tales como lipoproteínas y glucoproteínas. Los detergentes iónicos comunes incluyen, pero sin limitarse a, SDS, EDTA, colato y desoxicolato. Los detergentes iónicos son buenos agentes solubilizantes. Los anticuerpos conservan su actividad en SDS al 0,1 % o menos. Los detergentes no iónicos comunes incluyen, pero sin limitarse a, octilglucósido, digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20 y Tween 80. Los detergentes no iónicos y levente iónicos son desnaturizantes más débiles y, a menudo, se usan para disolver proteínas de la membrana tales como proteínas de la superficie viral. Agentes de lisis adicionales incluyen, pero sin

limitarse a, urea y enzimas. Se pueden usar combinaciones de diferentes agentes de lisis para optimizar el entorno de lisado.

5 Los tensioactivos actúan, en general, como agentes humectantes y rebajan la tensión superficial de un líquido. Esto permite a continuación una extensión más sencilla rebajando la tensión interfacial entre líquidos. De este modo, los tensioactivos pueden interferir en la unión natural de antígeno y anticuerpo o ligando y receptores. Las concentraciones se seleccionan, por lo tanto, experimentalmente para cada clase de agente de lisis. Una vez que se produce la lisis, es importante que las reacciones de unión deseadas no sean obstaculizadas. En general, una concentración de agente de lisis del 0,001 % se considera el límite inferior, y el límite superior es aproximadamente del 1 %. Existe un efecto aditivo o sinérgico cuando se usan combinaciones de agentes de lisis. Esto expande el intervalo de trabajo de concentración a realizar de aproximadamente el 0,001 % al 1 %. Finalmente, cierta unión inespecífica no deseada se puede evitar a una concentración de Tween 20 del 5 %. En todos los casos, la cantidad total de agente de lisis cargado previamente sobre todas las ubicaciones de una tira reactiva individual ha de ser suficiente para lisar barreras para la inmunodetección, permitiendo el funcionamiento práctico de la tira reactiva.

15 El propio agente de lisis no ha de interferir con ningún otro agente detector o indicador del ensayo y, por lo tanto, no interfiere en ninguna otra interacción y reacción en una medida tal para impedir el funcionamiento práctico del ensayo. Un agente de lisis ha de tener la suficiente vida útil para permitir la fabricación, distribución y almacenamiento antes del uso de una tira reactiva en pruebas de diagnóstico analítico inmediato.

20 En una realización preferida de la presente invención, el dispositivo de flujo lateral de la presente invención incluye un líquido de transporte de muestras, que puede ser un tampón, un compresor de muestras y una tira reactiva de cromatografía que contiene uno o varios materiales o membranas de superficie afelpada con propiedades de capilaridad a través de los cuales fluye la muestra. En un dispositivo y método de la invención, es innecesario lisar las células en la muestra antes de aplicar la muestra a la tira reactiva.

25 En algunas realizaciones preferidas, el dispositivo de flujo lateral incluye un compresor de muestras y una tira reactiva cromatográfica que incluye al menos una zona de desvío. La zona de desvío preferiblemente incluye al menos una característica que interrumpe el flujo en el plano en el que está teniendo lugar el flujo. La zona de desvío puede incluir una barrera, una separación, un surco, o cualquier combinación de estas características. La barrera es preferiblemente una membrana impermeable (o una membrana sustancialmente impermeable) que se puede fabricar de cualquier material que evite que el flujo de líquido continúe fluyendo en el mismo plano. Algunos materiales para la barrera incluyen, pero sin limitarse a, materiales inertes, materiales semipermeables, plásticos, hidrocarburos, metal, materiales hidrófobos, Sephadex, Sepharose, acetato de celulosa, un material higroscópico (por ejemplo, CaCl_2 , CaSO_4 o gel de sílice), o hidrogeles. La separación o surco es cualquier fisura en el plano de la tira reactiva de flujo lateral que se extiende hasta una profundidad suficiente para detener el flujo. En una realización preferida, la profundidad de la separación es preferiblemente de al menos aproximadamente 0,1 mm.

30 La zona de desvío retarda o detiene por completo el flujo hasta que el compresor de muestras se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido. El compresor de muestras actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras. Esto aumenta la recogida de los reactivos sobre el compresor de muestras. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que el conjugado se encuentra sobre el compresor de muestras, la recogida del conjugado aumenta en los dispositivos con una zona de desvío. En algunas realizaciones con un colector de muestras que está intercalado entre la tira reactiva y el compresor de muestras, también se fuerza que el fluido vaya a través del colector de muestras (por ejemplo, un hisopo), por lo tanto la muestra y el conjugado interactúan antes que en algunas realizaciones sin una zona de desvío. El fluido cambia de vuelta al plano lateral original en el extremo de la zona de desvío. En algunas realizaciones en las que tanto la zona de aplicación de muestra como el conjugado se encuentran sobre el compresor de muestras, tanto la muestra como el conjugado encuentran el tampón de migración cuando este se desvía hacia el compresor de muestras, y $\frac{1}{2}$ sándwich o un sándwich completo (dependiendo de en dónde esté ubicado el segundo socio de unión para el analito sobre el dispositivo de análisis de muestras) se forma antes de que el tampón de migración se esté desviando de vuelta a la tira reactiva si el analito se encuentra presente en la muestra. Algunas realizaciones con una zona de desvío y un compresor de muestras aumentan la velocidad, permiten unas mejores interacciones entre el conjugado y la muestra, y permiten más sensibilidad debido a que se coloca más conjugado en el fluido. En las presentes realizaciones, la totalidad del fluido preferiblemente interactúa con el conjugado. Esta es una mejora significativa frente a las realizaciones de compresor sin redireccionamiento, en las que aproximadamente un 20 - 30% del fluido interactúa con el conjugado.

35 40 45 50 55 60 65 En algunas realizaciones preferidas, el dispositivo de recogida de muestras es un papel de separación (por ejemplo, un papel de filtro) que es parte de la pila que incluye el compresor de muestras y la tira reactiva. El papel de separación preferiblemente sustituye a un elemento de hisopo como el colector de muestras. El papel de separación se fabrica preferiblemente de un material diferente de la nitrocelulosa de la tira reactiva o, en algunas realizaciones con una barrera, el material de la barrera. En algunas realizaciones preferidas, el papel de separación se fabrica de un material que incluye, pero sin limitarse a, glassine, un material revestido repelente del agua, o un material revestido con politetrafluoroetileno (por ejemplo, revestimiento de Teflon®) En algunas realizaciones, el papel de separación es una parte integrante de la tira, por ejemplo una solapa sobre la tira. En las presentes realizaciones,

una muestra de líquido se puede añadir por medio de un cuentagotas u otro mecanismo de adición. En otras realizaciones, el papel de separación está separado de la tira antes del uso, y es uno de los componentes de la pila mientras que se está realizando el ensayo. Un ejemplo de una muestra que preferiblemente podría usar este tipo de dispositivo de recogida de muestras es una muestra de líquido, incluyendo, pero sin limitarse a, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, o una muestra de orina. En algunas realizaciones que usan un papel de separación, el papel de separación podría contener otros reactivos útiles para el ensayo, por ejemplo, materiales de lisis *in situ*, o ser de una porosidad diferente para capturar los materiales interferentes.

En algunas realizaciones, la presión de compresión es suficiente para inhibir el flujo en sentido lateral sin la necesidad de una zona de desvío. No obstante, en algunas matrices, por ejemplo en matrices con fluidos más espesos, tal como moco, el flujo migra lentamente bajo el colector de muestras y no interactúa bien con el compresor. Algunas realizaciones con una zona de desvío son especialmente útiles con estos tipos de muestras y matrices. No obstante, la zona de desvío se podría usar en algunas realizaciones con cualquier tipo de muestra de líquido o fluido.

En otras realizaciones alternativas con o sin una zona de desvío, la muestra se podría colocar directamente sobre una zona de aplicación de muestra de la tira reactiva cromatográfica antes de la compresión o adición del tampón de migración. Por ejemplo, para muestras de líquido, la muestra se podría pipetear sobre una zona de aplicación de muestra. En otros ejemplos, la muestra se podría pipetear sobre el compresor de muestras.

El colector de muestras (por ejemplo, un hisopo o un papel de separación) se puede ubicar aguas arriba de la zona de desvío, sobre la zona de desvío, aguas abajo de la zona de desvío, o solapándose con porciones de la zona de desvío. En algunas realizaciones preferidas, el colector de muestras está ubicado aguas arriba de o aguas abajo con respecto a la zona de desvío. La longitud de la porción de recogida del elemento de hisopo debería ser lo bastante grande de tal modo que la totalidad de la muestra recogida se debería encontrar en contacto con la anchura de la tira reactiva. En algunas realizaciones preferidas, la longitud de la porción de recogida del colector de muestras es de aproximadamente 2 mm a 5 mm. En una realización más preferida, la porción de recogida del colector de muestras es de aproximadamente 3 a 4 mm. La longitud del colector de muestras (el asa) no es particularmente crítica. Pero, en algunas realizaciones preferidas, la longitud del colector de muestras es aproximadamente de 10 a 18 centímetros (de 4 a 7 pulgadas) dependiendo de en qué parte en el cuerpo se está tomando la muestra (por ejemplo, muestras de la garganta, nasofaríngeas o vaginales).

En algunas realizaciones en las que el colector de muestras es un elemento de hisopo, la porción de recogida del elemento de hisopo es compacta, para concentrar la muestra en una ubicación que puede interactuar con el tampón u otro medio de elución. La porción de recogida compacta es preferiblemente de una longitud más corta que las porciones de recogida de elemento de hisopo típicas de la técnica anterior. En algunas de las presentes realizaciones, en las que la porción de recogida se encuentra aguas arriba de la zona de desvío, la muestra concentrada puede interactuar con el tampón y desplazarse al compresor de muestras cuando se desvía el flujo. De forma similar, cuando la porción de recogida se encuentra aguas abajo, el tampón y los reactivos recogidos a partir del compresor de muestras (por ejemplo, el conjugado), interactúan con la muestra concentrada a medida que el flujo se desvía de vuelta sobre la tira reactiva cromatográfica.

En algunas realizaciones preferidas con una zona de desvío, el compresor está unido en una sola pieza a la tira reactiva cromatográfica por medio de una bisagra o solapa (véanse, por ejemplo, las figuras 8B y 24). Si el compresor de muestras no se baja correctamente usando la bisagra, el compresor de muestras nunca forma un puente sobre la zona de desvío, y el dispositivo no será funcional. La falta de compresión dará como resultado que el flujo no alcance nunca el extremo de la tira, y un resultado negativo en la línea de control. No hay flujo alguno si la bisagra no está cerrada. Por lo tanto, este dispositivo tiene un control integrado. Esto también es cierto en algunas realizaciones sin una bisagra. Cuando el compresor de muestras se añade a la pila vertical o el dispositivo de análisis de muestras, si hay una compresión insuficiente, no habrá puente y, en consecuencia, no habrá flujo.

En algunas realizaciones preferidas con una zona de desvío que incluye una barrera, la barrera es una barrera con componentes encapsulados. La barrera se disuelve con el tiempo, liberando los componentes encapsulados. La barrera puede incluir cualquiera o la totalidad de los mismos reactivos que se analizan en el presente documento como que se pueden encapsular. Una barrera que se está disolviendo realiza unas funciones duales. De forma similar a las otras barreras, esta actúa como una pared para forzar el flujo al interior del compresor de muestras. Además, la misma retarda en el tiempo determinados componentes mediante la encapsulación de los mismos. El tampón disuelve la barrera, y estos componentes retardados en el tiempo incidirán sobre el complejo de línea de prueba después de que los otros componentes del ensayo hayan alcanzado la línea de prueba.

La figura 1 muestra un dispositivo de análisis de muestras (tira reactiva) 1 y un colector de muestras 2. El colector de muestras 2 puede ser cualquier tipo de colector de muestras 2 conocido en la técnica, por ejemplo el colector de muestras 2 podría ser un elemento de hisopo. La muestra 20 puede incluir el analito 3, así como partículas interferentes 5 (que pueden incluir proteínas interferentes o genes interferentes) y otras partículas o restos celulares interferentes 4. El dispositivo de análisis de muestras 1 incluye una zona de conjugado 8 aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 18 en esta figura. A pesar de que la zona del conjugado 8 se muestra aguas arriba de la zona

de aplicación de muestra 18 en esta figura, la zona del conjugado 8 se puede solapar, como alternativa, con la zona de aplicación de muestra 18 o estar aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 18 dentro del espíritu de la presente invención. La zona de aplicación de muestra 18 es también una zona de microfiltración que, preferiblemente, elimina por filtración restos celulares y partículas interferentes 4 que se encuentran en la muestra 20.

La zona del conjugado 8, preferiblemente, incluye tanto un conjugado móvil 15, que incluye una parte que se une al analito 3 y un marcador detectable, como un socio de unión a la zona de control 16 con un marcador detectable, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de la zona de control con un marcador visual. En algunas realizaciones, el conjugado móvil es un conjugado al anticuerpo de prueba con un marcador visual. El socio de unión a la zona de control 16 se une con un socio de unión inmovilizado para él en la zona de control 11 e indica si la prueba se ha realizado correctamente. Si el analito 3 se encuentra presente en la muestra 20, el analito se une al conjugado 15, y el complejo conjugado 15 - analito 3 se desplaza hasta la zona de prueba 10 en la zona de detección 12. El analito 3 se une a continuación a un socio de unión inmovilizado 17 para el analito 3, para formar el "sándwich" completo en un ensayo de tipo sándwich.

La transferencia de la muestra desde el colector de muestras 2 a la zona de aplicación de muestra 18 sobre el dispositivo de análisis de muestras es, preferiblemente, una transferencia directa, es decir la transferencia tiene lugar sin pretratamiento de la muestra sobre el colector de muestras 2. En algunas realizaciones sin pretratamiento de la muestra o el colector de muestras 2, se aplica presión 14 y la microfiltración se produce en la región en la que la superficie afelpada del colector de muestras contacta directamente con la superficie afelpada sobre el dispositivo de análisis de muestras 1. Las fibras de la superficie afelpada se entrelazan para formar una red o interferencia física. Por lo tanto, elementos más grandes contenidos en la muestra, por ejemplo restos celulares y partículas interferentes 4 son retenidos y no se eluyen.

El dispositivo de aplicación de muestras 1 preferiblemente también incluye una zona de bloqueo 9 que incluye uno o más reactivos de captura. Esta zona de bloqueo captura proteínas y/o genes interferentes 5 que pueden estar en la muestra 20. La captura de una sustancia interferente 4, 5 por uno o más reactivos de captura se produce cuando el reactivo de captura interactúa de alguna manera con la sustancia interferente para evitar que la sustancia interferente interfiera en la detección del analito. A pesar de que una zona de bloqueo 9 se muestra en la figura 1, los reactivos de captura pueden estar ubicados en una zona de captura 9 hecha de materiales que permitan a los reactivos de captura ser móviles, en el medio de elución, mezclarse y secarse con los reactivos, incorporarse en la zona de aplicación de muestra, incorporarse en el material de la superficie afelpada del colector de muestras, y/o inmovilizarse sobre un material inmovilizante (por ejemplo, nitrocelulosa) como una línea o una zona. Cualquiera de estos o una combinación de estos se puede usar en las realizaciones de la presente invención, dependiendo de la prueba y la matriz de la muestra.

El dispositivo de análisis de muestras 1 también incluye de forma opcional una almohadilla absorbente 7 aguas arriba de la zona del conjugado 8 y la zona de aplicación de muestra 18. El tampón se añade y se desplaza en la dirección de la flecha 6 para eluir los componentes de prueba, incluyendo la muestra 20, el conjugado 15 y el socio de unión a la zona de control 16, a la zona de detección 12. El dispositivo de análisis de muestras 1 también incluye, preferiblemente, una almohadilla de desechos 13 en el extremo aguas abajo del dispositivo 1. El dispositivo de análisis de muestras 1 también puede incluir de forma opcional un sustrato 23.

Los dispositivos y métodos de la presente invención incluyen un compresor de muestras 30. Algunos ejemplos esquemáticos de compresores de muestras 30 que se podrían usar se muestran en las figuras 2A y 2B. Los compresores de muestras 30 preferiblemente incluyen un mango 31, una parte extendida 32 y una parte de almohadilla 33. En algunos diseños, el compresor de muestras incluye secciones adicionales, tal como una parte de repisa 34 sobre la cual está colocada la parte de almohadilla 33. A pesar de que se muestran ejemplos específicos en las figuras 2A y 2B, cualquier compresor de muestras 30 que es capaz de ejercer presión para transferir uno o más componentes del ensayo y la muestra al dispositivo de análisis de muestras, se podría usar en las realizaciones de la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, el conjugado 36 se carga previamente y se seca sobre una almohadilla 33 que forma la zona del conjugado. En algunas realizaciones preferidas, un control marcado 61 que es capaz de complejarse con un socio de unión en la zona de control también se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones preferidas, el segundo socio de unión 38 para el analito está ubicado sobre la almohadilla 33. Cualquier combinación del conjugado 36, el segundo socio de unión 38, o el socio de unión a la zona de control 61 puede estar sobre la parte de almohadilla 33 del compresor de muestras 30.

La figura 2C muestra un ejemplo de un colector de muestras 35. En este ejemplo, el colector de muestras 35 es un elemento de hisopo. El colector de muestras 35 preferiblemente incluye una parte de recogida de muestras 60 que, preferiblemente, está hecha de materiales de tipo superficie afelpada. En algunas realizaciones, el colector de muestras 35 es estéril.

Las figuras 3A a 3C muestran una realización de un sistema con un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). La tira reactiva preferiblemente

incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferiblemente un sustrato de soporte 48. La zona de detección 52 preferiblemente incluye una zona de prueba 45, que incluye un socio de unión inmovilizado 38 para el analito 40, así como una zona de control 46. En la presente realización, el conjugado 36 se encuentra sobre el compresor de muestras 30. El primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36, desde el compresor de muestras 30 se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich, que es transportado a continuación al segundo socio de unión 38 que está inmovilizado en una zona de prueba 45. El sándwich completo 420 que se forma entre la parte 37 del conjugado 36 que se une al analito 40, el analito 40 y el segundo socio de unión 38, se muestra en la figura 3B. En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión a la zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión a la zona de control 61 se compleja con su socio de unión en la zona de control 46. Incluir el socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, en lugar de sobre la tira reactiva o en el tampón, tal como se conoce en la técnica anterior, permite al usuario estar seguro de que los componentes sobre el compresor de muestras 30 que, en la presente realización, incluyen tanto el conjugado 36 como el socio de unión a la zona de control 61, han sido transferidos eficazmente al dispositivo de análisis de muestras y, por lo tanto, garantiza el funcionamiento apropiado del sistema.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión a la zona de control 61 es también preferiblemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unión a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en las figuras 3A - 3C de la presente invención se puede usar para cualesquiera ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

Durante el funcionamiento, el colector de muestras 35 se coloca de tal modo que la muestra esté directamente encima de la zona de aplicación de muestra 44. En algunas realizaciones, la colocación del colector de muestras 35 por encima de la zona de aplicación de muestra 44 no es simultánea con la colocación del compresor de muestras 30. En otras palabras, en las presentes realizaciones, parte de la muestra es transferida a la zona de aplicación de muestra 44 antes de que el compresor de muestras 30 se añada a la pila vertical.

El compresor de muestras 30 ejerce presión 51 sobre el colector de muestras 35, usando la presión para transferir la muestra, que incluye el analito 40 (si se encuentra presente) y el conjugado 36 sobre la zona de aplicación de muestra 44. Si también hay un socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, el socio de unión a la zona de control 61 también es transferido. Nótese que la transferencia es debida a la presión, no debida al flujo o a la acción de capilaridad. A continuación, se añade el tampón 43 para permitir el flujo del complejo conjugado 36 - analito 40 (si se encuentra presente) a la zona de detección 52. Un socio de unión inmovilizado 38 en la zona de prueba 45 se une a continuación al analito, formando el sándwich completo. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión a la zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

A pesar de que no se muestra, también puede haber de forma opcional una zona de lisis que, preferiblemente, se solapa con o se encuentra aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. En otras realizaciones, puede haber una zona de bloqueo que incluye reactivos de captura, de forma similar a la zona que se describe con respecto a la figura 1.

En otras realizaciones, la zona del conjugado puede contener ambos socios de unión para el analito en la muestra para formar un "sándwich completo". Uno de los socios de unión preferiblemente tiene un marcador adecuado tal como biotina, avidina, lectina, un resto glicosilo, un ligando específico o un receptor específico. El otro puede estar conjugado a las nanopartículas apropiadas, tal como se ha mencionado en lo que antecede. El sándwich completo es capturado a continuación en la zona de prueba en la que el socio de unión del marcador adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, avidina para biotina, biotina para avidina, resto glicosilo para lectina, lectina para el resto glicosilo, un receptor para el ligando o un ligando para el receptor, está inmovilizado.

La figura 20A muestra un ejemplo de una tira reactiva en una realización de la presente invención. La tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferiblemente un sustrato de soporte 48. En la presente realización, todo el sándwich (primer socio de unión 513 - analito 40 - segundo socio de unión-518) se forma en la zona de aplicación de muestra 44. El "sándwich completo" 514 se muestra en la figura 20B. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 511 que se une a la marca 519 del segundo socio de unión 518. La marca inmovilizada 511 no se une directamente al analito 40; en su lugar, se une a través de un intermediario, la marca 519 sobre el segundo socio de unión 518 para el analito 40.

En la presente realización, un primer socio de unión 513, que es parte del conjugado marcado 505, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 518 también incluye una marca 519. El segundo socio de unión 518, en la presente realización, preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva, mientras que el conjugado marcado 505, preferiblemente, se carga previamente y se seca sobre una zona del conjugado marcada 515 aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. Como alternativa, el segundo socio de unión 518 y/o la zona del conjugado marcada 515 pueden estar ubicadas en cualquier lugar sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección 52 incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra 44, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44 o entre la zona de aplicación de muestra 44 y la zona de detección 52. En una realización preferida, aproximadamente el 75 - 80 % del conjugado 505 marcado 509 se encuentra aguas arriba de la zona de aplicación de muestra (con aproximadamente el 20 - 25 % del conjugado marcado 505 solapándose con la zona de aplicación de muestra 44) y aproximadamente el 75 - 80 % del segundo socio de unión 518 está ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44 (con aproximadamente el 20 - 25 % del segundo socio de unión solapándose con la zona de aplicación de muestra 44). A pesar de que no se prefiere, en otras realizaciones, el conjugado marcado 505, el segundo socio de unión 518 o ambos pueden estar ubicados en el tampón o mezclarse previamente con la muestra antes de que la muestra se añada a la tira reactiva. En otras realizaciones más, cualquiera de o todos los componentes se podrían solapar con la zona de detección 52.

En algunas realizaciones, tanto el primer socio de unión 513 como el segundo socio de unión 518 son diferentes anticuerpos para el analito 40. En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en la figura 20A se puede usar para cualesquiera ensayos de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 518 está marcado 519 con biotina. En algunas realizaciones en las que la marca 519 sobre el segundo socio de unión 518 es biotina, la marca inmovilizada 511 en la zona de detección 52 es, preferiblemente, avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 518 está marcado 519 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 511 en la zona de detección 52 es, preferiblemente, biotina. Como alternativa, la marca 519 sobre el segundo socio de unión 518 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 511 puede ser un resto glicosilo dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

Durante el funcionamiento, un colector de muestras que contiene la muestra se coloca de tal modo que la muestra esté directamente por encima de la zona de aplicación de muestra 44. En algunas realizaciones preferidas, la muestra no ha sido sometida a pretratamiento antes de la aplicación a la tira reactiva. En su lugar, la muestra sigue estando en su forma nativa.

La muestra es transferida a la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. Se forma un sándwich con el conjugado marcado 505 como un trozo de pan y el segundo socio de unión 518 como el segundo trozo de pan, con el analito 40 entre ellos, cuando los tres componentes entran en contacto entre sí durante el flujo 43. El complejo conjugado marcado 505 - analito 40 (si se encuentra presente) - segundo socio de unión 518 (un sándwich completo) fluye hasta la zona de detección 52. Una marca inmovilizada 511 en la zona de prueba 45 se une a continuación a la marca 519. Debido a que el conjugado marcado 505 incluye un marcador 509, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46, preferiblemente debido a la interacción entre un socio de unión a la línea de control y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

A pesar de que no se muestra, también puede haber de forma opcional una zona de lisis que, preferiblemente, se solapa con la zona de aplicación de muestra 44 o está, como alternativa, ubicada en otras partes de la tira reactiva dentro del espíritu de la presente invención.

En algunas realizaciones preferidas que usan marcas, la zona de detección incluye un anticuerpo contra la marca. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal o de dominio único. Por ejemplo, cuando la marca es biotina, un anticuerpo anti-biotina se inmoviliza en la zona de prueba en lugar de avidina, neutravidina o estreptavidina.

Las figuras 4A a 4C muestran un ejemplo de una realización del sistema con un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35, y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). Similar a la figura 3A - 3C, la tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferiblemente un sustrato de soporte 48. En la presente realización, todo el sándwich (primer socio de unión 37 -

analito 40 - segundo socio de unión-38) se forma en la zona de aplicación de muestra 44 (preferiblemente antes de la adición de tampón). En algunas realizaciones, la colocación del colector de muestras 35 por encima de la zona de aplicación de muestra 44 no es simultánea con la colocación del compresor de muestras 30. En otras palabras, en las presentes realizaciones, parte de la muestra es transferida a la zona de aplicación de muestra 44 antes de que el compresor de muestras 30 se añada a la pila vertical.

La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y, preferiblemente, se carga previamente y se seca sobre almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización también preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39.

El sándwich completo 520 que se forma entre el socio de unión 37 del conjugado 36, el analito 40 y el segundo socio de unión 38 en la presente realización (así como las realizaciones en las figuras 5A - 5B, 6A - 6B, 7B, 7C y 7D) se muestra en la figura 4B. En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión a la zona de control 61 (mostrado en la figura 3C) con un marcador detectable. El socio de unión a la zona de control 61 se compleja con su socio de unión en la zona de control 46. Incluir el socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, en lugar de sobre la tira reactiva o en el tampón, tal como se conoce en la técnica anterior, permite al usuario estar seguro de que los componentes sobre el compresor de muestras 30, que incluyen tanto el conjugado 61 como el socio de unión a la zona de control 61, han sido transferidos eficazmente al dispositivo de análisis de muestras y por lo tanto garantiza el funcionamiento apropiado del sistema.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión a la zona de control 61 también es, preferiblemente, un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en las figuras 4A - 4C de la presente invención se puede usar para cualesquiera ensayos de unión, y puede evitar el uso de anticuerpos / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es, preferiblemente, biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

Durante el funcionamiento, el colector de muestras 35 se coloca de tal modo que la muestra esté directamente por encima de la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 ejerce presión 51 sobre el colector de muestras 35. La presión transfiere la muestra (incluyendo el analito 40, si se encuentra presente), el conjugado 36 y el segundo socio de unión marcado 38 sobre la zona de aplicación de muestra 44. Si hay también un socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, el socio de unión a la zona de control 61 también es transferido. Nótese que la transferencia es debida a la presión, no debida al flujo o la acción de capilaridad. A continuación, se añade tampón 43 para permitir el flujo del complejo conjugado 36 - analito 40 (si se encuentra presente) - segundo socio de unión 38 (un sándwich completo) hasta la zona de detección 52. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une a continuación a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión a la zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

A pesar de que no se muestra, también puede haber de forma opcional una zona de lisis, que preferiblemente se solapa con la zona de aplicación de muestra 44. En otras realizaciones, puede haber una zona de bloqueo que incluye reactivos de captura, de forma similar a la zona que se describe con respecto a la figura 1.

En otra realización, los dos socios de unión para el analito están ubicados de tal manera para conseguir un "sándwich vertical" en el que la muestra se une con el conjugado que está siendo comprimido desde el segundo plano y se puede unir simultánea o concurrentemente con el otro socio de unión ubicado sobre la tira en el plano de la tira. Por lo tanto una intercalación del analito en la muestra se consigue mediante unión al socio desde el

conjugado suministrado desde encima del plano de la tira y unión al segundo socio de unión ubicado sobre el plano de la tira por debajo del material de suministro de la muestra.

Las figuras 5A y 5B muestran otro ejemplo de una realización del sistema con un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). Similar a la figura 3A - 3C, la tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferiblemente un sustrato de soporte 48. Similar a la realización mostrada en las figuras 4A y 4C, en la presente realización, todo el sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) se forma en la zona de aplicación de muestra 44. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y, preferiblemente, se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en la presente realización puede estar ubicado en cualquier lugar sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra y entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección.

En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión a la zona de control 61 (mostrado en la figura 3C) con un marcador detectable. El socio de unión a la zona de control 61 se compleja con su socio de unión en la zona de control 46. Incluir el socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, en lugar de sobre la tira reactiva o en el tampón, tal como se conoce en la técnica anterior, permite al usuario estar seguro de que los componentes sobre el compresor de muestras 30, que incluyen tanto el conjugado 61 como el socio de unión a la zona de control 61, han sido transferidos eficazmente al dispositivo de análisis de muestras y, por lo tanto, garantiza el funcionamiento apropiado del sistema.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión a la zona de control 61 también es, preferiblemente, un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en las figuras 5A - 5B de la presente invención se puede usar para cualesquiera ensayos de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferiblemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

Durante el funcionamiento, el colector de muestras 35 se coloca de tal modo que la muestra esté directamente por encima de la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 ejerce presión 51 sobre el colector de muestras 35, usando la presión para transferir la muestra (incluyendo el analito 40, si se encuentra presente) y el conjugado 36 sobre la zona de aplicación de muestra 44. Un sándwich "vertical" se forma con el conjugado 36 como pieza superior y el segundo socio de unión 38 como pieza inferior, con el analito 40 entre ellos. Si hay también un socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, el socio de unión a la zona de control 61 también es transferido. Nótese que la transferencia es debida a la presión, no debida al flujo o la acción de capilaridad. A continuación, se añade el tampón 43 para permitir el flujo del complejo conjugado 36 - analito 40 (si se encuentra presente) - segundo socio de unión 38 (un sándwich completo) hasta la zona de detección 52. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une a continuación a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46, debido a la interacción entre el socio de unión a la zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

A pesar de que no se muestra, también puede haber de forma opcional una zona de lisis, que preferiblemente se solapa con o está ubicada aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. En otras realizaciones, puede haber una zona de bloqueo que incluye reactivos de captura, de forma similar a la zona que se describe con respecto a la

figura 1.

Las figuras 6A y 6B muestran otra realización de la presente invención, en la que el compresor de muestras 30 incluye el segundo socio de unión 38 para el analito 40, acoplado con una marca 39, y la tira reactiva incluye el conjugado 36, que incluye tanto un primer socio de unión 37 para el analito 40 como un marcador detectable 41, y la marca inmovilizada 50 que se une a la marca sobre el segundo socio de unión en la zona de prueba 45. La presente realización funciona análogamente a la realización que se describe con respecto a las figuras 5A y 5B, excepto que el sándwich "vertical" se forma con el segundo socio de unión 38 como pieza superior y el conjugado 36 como pieza inferior, con el analito 40 entre ellos. Como alternativa, el conjugado 36, en la presente realización, puede estar ubicado en cualquier lugar sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra o entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección.

Las figuras 7A a 7D son similares a las figuras 3C, 4C, 5B y 6B, respectivamente, excepto que la zona de detección 52 se solapa con la zona de aplicación de muestra 44, en estas figuras. La zona de detección, en las presentes realizaciones, está hecha preferiblemente de nitrocelulosa. A pesar de que no se requiere estrictamente ningún flujo lateral para ejecutar el ensayo en las presentes realizaciones, se prefiere al menos una cantidad nominal de flujo, de tal modo que el sándwich sea capaz de unirse en la zona de prueba y cualquier conjugado no unido sea eliminado por lavado de la zona de prueba. En una realización, en lugar de un tampón de migración que es aplicado en un extremo de la tira reactiva, un fluido de lavado se puede aplicar directamente a la zona de prueba, desde arriba o desde el lado, por ejemplo usando un frasco de agua. En una realización, el compresor de muestras y el colector de muestras son sustancialmente transparentes, de tal modo que la zona de prueba se pueda leer sin la retirada de la pila vertical de la tira reactiva. Nótese que, a pesar de que tanto la zona de prueba 45 como el control 46 se muestran dentro de la zona de aplicación de muestra en estas figuras, en otras realizaciones la zona de prueba 45 se podría solapar con la zona de aplicación de muestra 44 mientras la zona de control 46 se encuentra aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. Si la zona de control estuviera en sentido lateral aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44, sería necesario añadir tampón para permitir el flujo. Además, puede ser preferible añadir un tampón, por ejemplo un tampón que incluye plata, para intensificar la señal de un resultado positivo.

Una tira reactiva universal 80, tal como se muestra en la figura 8A, se puede usar cuando el compresor de muestras 30 incluye ambos de los socios de unión 37, 38 para el analito 40. El compresor de muestras 30 y el colector de muestras 35 serían transferidos a la tira reactiva universal 80 en la ventana de la muestra 81. Debido a que los elementos específicos para el analito 40, que está siendo puesto a prueba, se encuentran sobre el compresor de muestras 30, la zona de prueba 83 en la ventana de visualización 82 de la tira reactiva universal 80 solo necesita tener una marca 50 que se compleja con la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 para el analito 40. Por ejemplo, cuando el segundo socio de unión 38 para el analito 40 está marcado 39 con biotina, la zona de prueba 83 de la tira reactiva universal 80 incluiría avidina 39, un socio de unión para biotina. La tira reactiva universal 80 también incluye preferiblemente una zona de control 84 y una carcasa 85. Para las realizaciones de las figuras 7A a 7D, la zona de prueba está ubicada en la ventana de la muestra 81. En otras realizaciones, el marcador adecuado puede ser una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la secuencia de ácido nucleico adecuada inmovilizada en la zona de prueba.

A pesar de que el compresor de muestras y el colector de muestras se muestran como entidades independientes en las figuras 1 - 8A, la almohadilla 33 del compresor de muestras y la parte colectora de muestras 60 del colector de muestras pueden ser componentes de un único elemento dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el colector de muestras puede estar conectado de forma que pueda girar o de forma flexible o como parte de un cartucho al compresor de muestras, de tal modo que una muestra pueda ser recogida de un paciente con la parte de recogida de muestras sin exponer al paciente a la almohadilla de compresor de muestras y, a continuación, la parte de recogida de muestras y la almohadilla de compresor de muestras se pueden poner en contacto para aplicación a la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva por compresión. El colector de muestras también puede estar conectado de forma que pueda girar o de forma flexible a la casete de prueba o se puede insertar como un cartucho. En otra realización, la muestra se puede inyectar de forma forzada directamente sobre la tira reactiva antes de colocar el compresor y/o los conjugados en posición. En otra realización más, el colector de muestras puede contactar con los conjugados en un cartucho externo que, a continuación, encaja o se inserta en una casete de prueba para poner al material en contacto con la tira reactiva. En otra realización, la muestra se puede aplicar al compresor de muestras.

En algunas realizaciones, el compresor de muestras 30 está conectado, de forma que pueda girar, a la carcasa 85 tal como se muestra en la figura 8B. Mientras que la bisagra del compresor de muestras 30 se muestra de tal modo que el compresor de muestras 30 esté girado hacia el extremo aguas abajo de la tira cuando está abierto, la carcasa podría estar diseñada de tal modo que el compresor de muestras 30 está articulado a cualquier lado o en otras direcciones dentro del espíritu de la presente invención. La parte de recogida de muestras 60 del colector de muestras 35 está, preferiblemente, insertada desde el lado de tal modo que se alinea con un agujero de inserción 88 en el lado de la carcasa 85. No obstante, el colector de muestras 35 se podría insertar en cualquier dirección dependiendo del diseño de la carcasa. El compresor de muestras 30 preferiblemente incluye una almohadilla (no visible en la figura 8B), con uno o más componentes de ensayo, ubicada sobre la superficie del compresor de

muestras orientada hacia la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva 80. El compresor de muestras 30 se cierra a continuación de tal modo que una presión de compresión se aplica a la pila vertical de la almohadilla de compresor de muestras, la parte de recogida de muestras y la zona de aplicación de muestra para transferir la muestra y los uno o más componentes de ensayo a la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva. A pesar de que hay una almohadilla absorbente que se proyecta desde la carcasa en el extremo aguas arriba alejado del dispositivo en la figura 8B, la longitud de la almohadilla absorbente puede variar. De hecho, mientras se pueda añadir tampón en el extremo aguas arriba (por ejemplo, a través de una ventana de aplicación en la carcasa), no es necesario hacer que la almohadilla absorbente se extienda significativamente fuera de la carcasa. En la presente realización, no existe ninguna posibilidad de perder el compresor de muestras, y no existe ninguna necesidad de alinear el compresor de muestras con la zona de aplicación de muestra cuando se forma la pila vertical. Una ventaja de las presentes realizaciones es que permiten un lapso de tiempo entre la aplicación de muestra y el inicio real de flujo a la zona de prueba. En otras palabras, el sándwich se puede preparar previamente, y el flujo iniciarse mucho más tarde.

Como alternativa, la almohadilla 33 puede ser independiente del compresor de muestras. La almohadilla puede estar sobre un aplicador del socio de unión similar al colector de muestras. En las presentes realizaciones, el aplicador del socio de unión puede estar ubicado entre la parte de recogida de muestras y la zona de aplicación de muestra cuando la presión es aplicada por el compresor de muestras para transferir la muestra a la zona de aplicación de muestra.

La figura 9 muestra una pila vertical que incluye un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35 con una parte de recogida de muestras 60, un aplicador del socio de unión 62 con una almohadilla del aplicador 64 y una zona de aplicación de muestra 44 de una tira reactiva. A pesar de que el aplicador del socio de unión 62 incluye un mango en la figura 9, el aplicador del socio de unión 62 podría, como alternativa, simplemente ser una almohadilla. La parte de repisa 34 del compresor de muestras 30 aplica presión a la parte de recogida de muestras 60 cargada con una muestra y la almohadilla del aplicador 64 cargada con al menos un socio de unión para un analito para el que se realizarán pruebas en la muestra. La presión preferiblemente empuja a al menos una parte de la muestra desde la parte de recogida de muestras 60 para humedecer la almohadilla del aplicador 64, movilizándolo de este modo parte del socio de unión, de tal modo que al menos parte de la muestra y parte del socio de unión son transferidas a la zona de aplicación de muestra 44. En algunas realizaciones, esta transferencia se produce sin dilución. En algunas realizaciones con pequeños volúmenes de muestra o muestras viscosas o sólidas, no obstante, se puede usar un líquido adicional para facilitar la transferencia de la muestra y el socio de unión a la tira reactiva. En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 9, el compresor de muestras no tiene ninguna almohadilla, a pesar de que se puede usar una almohadilla para ayudar en la transferencia, tal como suministrando líquido o tampón adicional, dentro del espíritu de la presente invención. En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 9, la parte de recogida de muestras 60 está ubicada entre el compresor de muestras 30 y la almohadilla del aplicador 64 en la pila vertical para ayudar en la transferencia del socio de unión a la tira reactiva durante la compresión. Como alternativa, la almohadilla del aplicador 64 puede estar colocada entre el compresor de muestras 30 y la parte de recogida de muestras 60 dentro del espíritu de la presente invención. En algunas realizaciones en las que el sándwich completo se forma antes de alcanzar la zona de prueba, se pueden usar dos aplicadores del socio de unión (un aplicador independiente para cada socio de unión de analito), con la parte de recogida de muestras, estando la primera almohadilla del aplicador y la segunda almohadilla del aplicador colocadas en cualquier orden sobre la pila vertical. Como alternativa, un único aplicador del socio de unión podría incluir ambos de los socios de unión para el analito. En otras realizaciones, la muestra, el primer socio de unión y el segundo socio de unión se pueden aplicar de forma secuencial a la tira reactiva en cualquier orden usando el compresor de muestras dentro del espíritu de la presente invención.

En un método de aplicación de una muestra a una tira reactiva de un dispositivo de flujo lateral, al menos un socio de unión externo se coloca en primer lugar sobre la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva. El socio de unión externo puede estar ubicado sobre una almohadilla externa. En algunas realizaciones en las que hay dos socios de unión al analito, que se unen al analito antes de alcanzar la zona de prueba, se pueden añadir uno o ambos de los socios de unión al analito. Un colector de muestras que incluye la muestra se coloca en una pila vertical entre el socio de unión externo y un compresor de muestras. El compresor de muestras aplica presión al colector de muestras para transferir el socio de unión externo y al menos una parte de la muestra a la zona de aplicación de muestra. Como alternativa, el socio de unión externo se podría añadir y ser comprimido por el compresor de muestras, a continuación retirado, antes de que el colector de muestras se aplique por encima de la zona de aplicación de muestra, en la que la muestra es comprimida sobre la tira reactiva. En otra realización alternativa, al menos un socio de unión externo se coloca en la pila vertical entre el compresor de muestras y el colector de muestras. Como alternativa, el colector de muestras se añade y se comprime, a continuación se retira y, a continuación, el socio de unión externo se añade y se comprime sobre la tira reactiva. En otras realizaciones, el colector de muestras se encuentra en una pila vertical entre un primer socio de unión externo y un segundo socio de unión externo, y el compresor de muestras aplica presión a la pila vertical. En las presentes realizaciones, ni la tira ni el compresor de muestras tienen un socio de unión de analito específico. La muestra, el socio de unión al analito y el socio de unión de control también se puede aplicar a la zona de aplicación de muestra en múltiples etapas en cualquier combinación dentro del espíritu de la presente invención.

Como alternativa, en un dispositivo de flujo lateral de la presente invención, el compresor de muestras puede ser un compresor de muestras universal sin componentes específicos para el analito de interés. En una realización, el compresor de muestras no contiene componentes del ensayo. En algunas realizaciones con a control, la almohadilla de compresor de muestras contiene solo el socio de unión a la zona de control móvil. En algunas de las presentes realizaciones, uno o más aplicadores del socio de unión incluyen al menos un socio de unión para el analito y se convierten en parte de la pila vertical con el compresor de muestras y el colector de muestras cuando la muestra es transferida a la zona de aplicación de muestra. La muestra, el socio de unión al analito y el socio de unión de control móvil también se pueden aplicar a la zona de aplicación de muestra en múltiples etapas en cualquier combinación dentro del espíritu de la presente invención.

En otra realización de la presente invención, el compresor de muestras 30 también sirve como colector de muestras, y la almohadilla 33 del compresor de muestras también sirve como parte de recogida de muestras. En la presente realización, el conjugado, el segundo socio de unión, el socio de unión a la línea de control y/o cualquier combinación de los tres, están preferiblemente ubicados sobre una superficie posterior de la almohadilla 33, en la que la almohadilla está fijada al brazo del compresor de muestras. En algunas realizaciones en las que es necesario realizar la recogida de muestras de forma estéril, el compresor de muestras 30 es esterilizado preferiblemente a continuación por radiación antes del uso como colector de muestras. La muestra es recogida a continuación usando la parte frontal de la almohadilla de tal modo que el paciente no es expuesto al conjugado o el segundo socio de unión durante la adquisición de la muestra. Cuando la muestra se aplica a la zona de aplicación de muestra de la tira reactiva, la almohadilla es, preferiblemente, comprimida de tal modo que la muestra se mezcla con el conjugado o el segundo socio de unión y al menos una parte de ambos es exprimida sobre la tira reactiva. En otras realizaciones, la muestra que se ha recogido se transfiere de un colector de muestras (por ejemplo, una pipeta) a la almohadilla del compresor de muestras antes de la realización del ensayo.

En algunas realizaciones, un dispositivo de flujo lateral de la presente invención también puede incluir un sistema de amplificación de señales incorporado, en línea o *in situ*. El sistema de amplificación de muestras se puede usar en combinación con un compresor de muestras o en un método o dispositivo sin un compresor de muestras dentro del espíritu de la presente invención. En algunas realizaciones en las que se usa oro coloidal como marcador detectable para el conjugado, la señal del oro coloidal en el conjugado unido a la zona de prueba se puede amplificar adicionalmente mediante intensificación con plata. Formulaciones adecuadas de sales de plata y los agentes de revelado de plata se pueden secar en el sitio de aplicación de muestra o aguas arriba de éste o aguas abajo de éste. Las sales de plata y los agentes de revelado se pueden secar de forma conjunta, aguas arriba o aguas abajo entre sí, o pueden estar separados por el área de aplicación de muestra. En otras realizaciones, las sales de plata y/o los agentes de revelado de plata se encapsulan para crear un retardo de tiempo para la intensificación, permitiendo de ese modo que se forme un sándwich completo en la línea de prueba antes de que tenga lugar la intensificación de plata.

En otras realizaciones, el apilamiento, en el que el sistema incluye un conjugado con un antígeno adicional y un segundo conjugado, que es preferiblemente una nanopartícula, con el socio de unión específico del antígeno, se usa para amplificar la señal. El segundo conjugado también incluye preferiblemente un marcador. En el segundo conjugado, el socio de unión puede estar conjugado a una partícula que es del mismo tamaño, más pequeña o de mayor tamaño de la partícula en el primer conjugado. En algunas realizaciones, el antígeno y el segundo conjugado están encapsulados. En otras realizaciones más, tanto la intensificación con plata como la intensificación por apilamiento se pueden usar sobre la misma tira reactiva. El conjugado y los elementos de intensificación con plata de apilamiento pueden estar juntos o aguas arriba o aguas abajo entre sí. Una característica preferida de las presentes realizaciones es que las nanopartículas y/o intensificadores de plata “de apilamiento” no entran en contacto con el conjugado inicialmente sino que entran en contacto solo mientras el conjugado está inmovilizado en la zona de prueba. Por lo tanto, se consigue una mejor especificidad. En algunas realizaciones, uno o ambos de los elementos de intensificación de plata y/o los elementos de intensificación de apilamiento se encapsulan para crear un retardo de tiempo para la amplificación de la señal.

En algunas realizaciones en las que un “sándwich completo” está formado entre el analito 40, el primer socio de unión al analito 37 y el segundo socio de unión al analito 38 antes de que el complejo alcance la zona de detección 52 (véase, por ejemplo, las figuras 4A - 4C, 5A - 5B, y 6A - 6B), la intensificación con plata u otras señales de amplificación se pueden colocar aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44 de tal modo que la sal de plata y/o agente de revelado de plata interactúa con el sándwich completo antes de que el complejo alcance la zona de detección 52. En otras realizaciones con un sándwich completo, la sal de plata y/o agente de revelado de plata están ubicados aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44 de tal modo que el sándwich completo se forma y se desplaza hasta la sal / agente de revelado de plata antes de alcanzar la zona de detección 52.

En la técnica anterior, tal como se muestra en la figura 10, hay una correspondencia uno a uno entre el analito 40 y el marcador 41 en la zona de prueba 45, debido a que cada analito se une a un socio de unión inmovilizado 38 y un socio de unión móvil 37 sin ningún marcador 41 sobre el conjugado 36.

En un sistema de amplificación de señales de la presente invención, la fuente de amplificación puede estar ubicada en cualquier lugar sobre la tira reactiva, incluyendo en la zona de aplicación de muestra, o aguas arriba o aguas

abajo de ésta. Como alternativa, la fuente de amplificación puede estar ubicada en el tampón o sobre el compresor de muestras. Cualquiera o la totalidad de los elementos de amplificación se pueden encapsular.

5 En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 11, la fuente de amplificación 70 se deposita no específicamente sobre el conjugado, de tal modo que múltiples conjugados están asociados con un analito unido en la zona de prueba. En la presente realización, la fuente de amplificación es, preferiblemente, una o más sales de plata, y un agente de revelado de plata se puede usar para intensificar la señal en ensayos usando oro coloidal como la parte de marcador 41 del conjugado. Las sales de plata y el agente de revelado de plata se pueden ubicar o introducir de cualquier manera para intensificar la detección del analito. En algunas realizaciones en las que se usa 10 oro coloidal como marcador detectable para el conjugado, la señal del oro coloidal en el conjugado unido en la zona de prueba se puede amplificar mediante intensificación con plata. Formulaciones adecuadas de sales de plata y los agentes de revelado de plata se pueden secar en el sitio de aplicación de muestra aguas arriba de éste o aguas abajo de éste. Las sales de plata y los agentes de revelado se pueden secar de forma conjunta, aguas arriba o aguas abajo entre sí, o separados por el área de aplicación de muestra. Como alternativa, sales y/o agentes de 15 revelado de plata pueden estar incluidos como parte del tampón. En algunas realizaciones preferidas, las sales de plata y/o el agente de revelado de plata se pueden encapsular.

20 En una realización preferida, la mezcla de las sales de plata y agentes de revelado se seca en un área entre la zona de aplicación de muestra y la zona de prueba. En la presente realización, un sándwich completo del analito entre dos socios de unión (estando uno un conjugado sobre oro y el otro marcado adecuadamente con marcadores tales como biotina) se mueve al interior del área de intensificación con plata y juntos se desplazan a la zona de prueba en la que son capturados. A pesar de que la intensificación con plata se puede aplicar al medio sándwich antes de la captura, la intensificación con plata se aplica preferiblemente después de la captura, dado que, en caso contrario, puede interferir en la unión en la zona de prueba. Las sales de plata y los agentes de revelado se pueden usar en 25 cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a las mostradas en las figuras 3A - 3C, 4A - 4C, 5A - 5B, 6A - 6B, y 7A - 7D.

30 En otra realización más, el área de intensificación con plata está ubicada directamente debajo del material de aplicación de muestra. El compresor con ambos socios de unión, tal como se han descrito en lo que antecede, formarían el sándwich completo y se volverían potenciados por sales de plata y agentes de revelado todos en su lugar. Este megacomplejo se puede mover a continuación al interior de la zona de prueba en la que puede ser capturado.

35 En otra realización más, la intensificación con plata se consigue incorporando las sales de plata y los agentes de revelado en el tampón de migración. En otras realizaciones, las sales de plata y/o el agente de revelado de plata pueden estar ubicados sobre el compresor de muestras o el colector de muestras en situaciones en las que no es necesario que el colector de muestras sea estéril. En caso contrario, el colector de muestras se puede esterilizar después de la adición de las sales de plata y/o el agente de revelado de plata usando técnicas de esterilización, tales como, por ejemplo, radiación, que no dañan las sales de plata y/o el agente de revelado de plata. 40

45 En otra realización más, las sales de plata se secan en el sitio, aguas arriba, o aguas abajo del área de aplicación de muestra y el agente de revelado de plata se puede añadir a la ventana de visualización como una etapa independiente.

50 En una realización preferida que implica la intensificación con plata, debido a que la plata es sensible a la luz, la prueba se realiza boca abajo (con la casete dada la vuelta en algunas realizaciones en las que se usa una casete) o protegida de otro modo de la luz ambiente antes de que se complete la prueba.

55 En otra realización, la intensificación con plata se consigue como una etapa independiente en la que la sal de plata y el agente de revelado se añaden juntos o por separado al área de la ventana de visualización 82 en la que está ubicada la zona de prueba 83. Si no hay ningún área de la ventana de visualización 82, la sal de plata y el agente de revelado se añaden, preferiblemente, a la zona de prueba 83 de la tira. En algunas de las presentes realizaciones, la intensificación con plata se añade a la tira reactiva mientras sigue estando húmeda o seca después del uso. En algunas de las presentes realizaciones, la tira se retira de cualquier carcasa y una parte de la tira que contiene la zona de prueba 83 se corta y se trata con intensificación con plata de forma conjunta o por separado.

60 En una realización preferida, después de que se ha realizado la prueba, se deja secar a la tira al aire. El secado moderado de la tira se consigue en aproximadamente de 20 a 30 minutos, pero depende de las condiciones medioambientales. Después de que la tira se ha secado, una gota o dos de la sal de plata y los agentes de revelado se añaden al área de la ventana de visualización 82 en la que está ubicada la zona de prueba 83. Si no hay ningún área de la ventana de visualización 82, la sal de plata y el agente de revelado se añaden, preferiblemente, a la zona de prueba 83 de la tira. Esto intensifica la sensibilidad al menos 5 veces. La sal de plata y los agentes de revelado se pueden añadir de forma conjunta o por separado. La intensificación con plata se produce casi instantáneamente y los resultados se leen preferiblemente en el plazo de dos a tres minutos después del añadido de la intensificación 65 con plata. Si los resultados no se leen rápidamente, la tira se puede volver negra y el fondo interferirá en la lectura de la línea de prueba gris / negra resultante. Este fondo se puede reducir al mínimo en gran medida si se añade una

solución de lavado a la ventana de visualización 82 / zona de prueba 83. La sensibilidad se puede intensificar adicionalmente con el uso de un lector óptico portátil, por ejemplo un espectrómetro en miniatura fabricado por Ocean Optics, Inc. (Dunedin, Florida). Un lector portátil es un espectrómetro en miniatura de mano, que cuantifica la intensidad del color de la línea de prueba que mide la absorbancia o la reflectancia del complejo marcado que se une a la línea de prueba. La cuantificación de la línea de prueba se puede determinar mediante el uso de una curva patrón. En el desarrollo de una curva patrón, se crean varias valoraciones de la concentración del analito y se registra la salida del lector en cada valoración. El lector incrementa la sensibilidad de una prueba en 5 a 10 veces. Durante el funcionamiento, la ventana de detección para ver la línea de prueba visible se coloca directamente sobre o en las proximidades de la abertura del espectrómetro, de tal modo que se pueda realizar una medición directa de absorbancia o reflectancia.

En otra realización preferida, la solución de sal de plata y/o agente de revelado incluye un líquido volátil. La sal de plata y el agente de revelado se podrían preparar juntas en una única solución o como soluciones independientes. Cualquier líquido que se evapora a temperatura ambiente o se vaporiza fácilmente y no interfiere en la prueba se podría usar. El disolvente volátil se selecciona de tal manera que no disuelve el material de la membrana (por ejemplo, nitrocelulosa) que compone la zona de prueba 83 en la que el segundo socio de unión 17 (véase la figura 1), 38 (véase las figuras 3A - 3C y 7A) o la marca inmovilizada 50 (véase las figuras 4A - 4C, 5A - 5B, 6A - 6B y 7B - 7D) están ubicados. Algunos ejemplos de un líquido volátil que se podrían usar incluyen, pero sin limitarse a, metanol, alcohol isopropílico, bajas concentraciones de benceno y bajas concentraciones de acetona. La intensificación con plata tiene la sal de plata y un agente de revelado que es, preferiblemente, de naturaleza relativamente orgánica. La solución de sal de plata y agente de revelado se añade al área de la ventana de visualización 82 en la que la zona de prueba 83 está ubicada al final de la prueba (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos después de que la muestra se añadió a la tira), cuando la tira sigue estando bastante húmeda. Si no hay ningún área de la ventana de visualización 82, la sal de plata y el agente de revelado se añaden preferiblemente a la zona de prueba 83 de la tira. El líquido volátil "seca" el área en la que se añade el líquido (la zona de prueba 83). En la presente realización, no es necesario esperar a que toda la tira esté moderadamente seca. La presente realización crea secado "in-situ" de solo el área de interés (la zona de prueba 83).

En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 12, la amplificación se debe a un fenómeno de "apilamiento" en el que un segundo conjugado 74 "se apila" sobre al menos una parte del complejo formado durante el ensayo. En las presentes realizaciones, el primer conjugado 72 incluye una parte adicional 73 a la que un socio de unión 76 de la parte 73 se une específicamente, y el segundo conjugado 74 preferiblemente también incluye un marcador 78. Por ejemplo, cuando el segundo socio de unión 38 incluye una marca de avidina 39, el sándwich completo es capturado en la zona de prueba por biotina inmovilizada 50, y posterior o concurrentemente, el conjugado "de apilamiento" se acumula o se apila sobre el sándwich completo inmovilizado en la zona de prueba, dando origen a más acumulación apilada y mejor percepción de señales. En una realización, el primer conjugado es oro conjugado a un anticuerpo del analito e IgY de pollo, y el segundo conjugado es una perla de látex rojo conjugada a un antígeno de conejo anti-IgY de pollo.

Preferiblemente, el "apilamiento" se usa solo en algunas realizaciones en las que el "sándwich completo" se forma antes de alcanzar la zona de prueba. Por ejemplo, en las figuras 4C, 5B, 6B, 7B, 7C y 7D, un sándwich completo se forma en la zona de aplicación de muestra. En una realización preferida, anticuerpo de ratón sobre conjugado marcado se une a un antígeno para formar un primer complejo. El primer complejo se une inmediatamente al anticuerpo policlonal marcado con biotina movilizado para formar un sándwich completo como un segundo complejo. El segundo complejo es capturado a continuación en la zona de prueba por avidina mediante el marcador de biotina. El conjugado con marcador anti-ratón liberado lentamente se une a continuación y se aplica sobre el anticuerpo de ratón en el segundo complejo en la zona de prueba. El conjugado con marcador anti-ratón está ubicado preferiblemente de tal modo que alcance la zona de prueba después de que se han formado los complejos de analito. Algunas ubicaciones preferidas para el conjugado con marcador anti-ratón incluyen en la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, añadido al tampón después de una cantidad de tiempo predeterminada, aplicado a la zona de prueba después de que el sándwich se ha formado o en la trayectoria de flujo pero encapsulado para retardar su liberación, por ejemplo, durante 20 a 30 segundos. En la presente realización, el apilamiento incrementa la sensibilidad del ensayo de 3 - 5 veces.

En algunas realizaciones de la presente invención con conjugados de oro, que se pueden usar en todos los ensayos de flujo lateral, un anticuerpo anti-IgY de pollo marcado y secado u otro resto inmunógeno inespecífico, se incorpora en la tira reactiva aguas arriba de la zona de aplicación de muestra o, como alternativa, en el tampón. Cuando la muestra es de mamífero (por ejemplo, ser humano), el resto inmunógeno inespecífico es, preferiblemente, de un organismo no mamífero tal como, por ejemplo, un ave, un pez o una planta, de tal modo que no interfiera en la unión al analito. El segundo conjugado, por ejemplo anti-IgY de pollo, es movilizado a continuación por el tampón. Retardar la movilización del segundo conjugado permite que el sándwich completo fluya y comience la unión mediante una marca inmovilizada con una marca, por ejemplo biotina-avidina, captura en la zona de prueba en el caso de un segundo socio de unión móvil. El sándwich completo se acumula en la zona de prueba, seguido por unión y apilamiento del segundo conjugado, por ejemplo perlas de látex de color rojo, encima del primer conjugado, por ejemplo oro. La presente realización también incrementa la sensibilidad del ensayo de 3 - 5 veces. En algunas realizaciones en las que el segundo socio de unión para el analito se inmoviliza en la zona de prueba, el medio

sándwich preferiblemente se desplaza hasta la zona de prueba, seguido por unión y apilamiento.

La figura 11 muestra amplificación inespecífica y la figura 12 muestra amplificación específica. En otras realizaciones, se podrían usar combinaciones de tanto amplificación específica como amplificación inespecífica, para amplificar adicionalmente la señal. Como un ejemplo, la primera amplificación se debe a un fenómeno de "apilamiento" tal como se ha mostrado y descrito en lo que antecede con respecto a la figura 12 en la que un segundo conjugado 74 "se apila" sobre al menos una parte del complejo formado durante el ensayo. Se proporciona una amplificación adicional cuando una fuente de amplificación 70 se deposita a sí misma de forma inespecífica sobre el conjugado, de tal modo que múltiples conjugados se asocien con un analito unido en la zona de prueba, tal como se ha mostrado y descrito en lo que antecede con respecto a la figura 11. Como alternativa, se podrían usar otras combinaciones de amplificación específicas e inespecífica.

En otra realización de apilamiento e intensificación de señales, la intensificación se realiza usando una enzima conjugada al resto de apilamiento. En un ejemplo, la enzima es peroxidasa de rábano picante, y está conjugada a un anticuerpo de conejo anti-ratón. A pesar de que la peroxidasa de rábano picante se usa a menudo para amplificar una señal débil, se podrían usar, como alternativa, otras enzimas que intensifican señales débiles incluyendo, pero sin limitarse a, fosfatasa alcalina, catalasa, ureasa y glucosa oxidasa. Análogamente, se podrían usar como alternativa otros anticuerpos que se unen al conjugado o un intermediario. No hay nanopartículas o microesferas en la presente realización. En su lugar, la presente realización incluye una forma "soluble" del conjugado. La ubicación en la que se seca este conjugado enzimático puede variar; se puede encontrar aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de muestra. En algunas realizaciones con un compresor de muestras, el conjugado enzimático podría estar, como alternativa, sobre el compresor de muestras. El conjugado enzimático se seca, preferiblemente, sobre la tira reactiva, pero no se inmoviliza. Puede estar ubicado en solitario o en combinación con otros componentes que forman el "sándwich" con el anticuerpo (que está, preferiblemente, biotinilado) y/o el anticuerpo conjugado a oro.

La figura 14 muestra una realización de un detector con una enzima conjugada al resto de apilamiento. La zona de control 46 incluye un primer socio de unión de control inmovilizado 110. La zona de prueba 45 incluye un primer socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 109 sobre la membrana. Un primer socio de unión al analito 102 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 101 se seca o se incorpora de otro modo (por ejemplo, se liofiliza) en la zona de aplicación de muestra 44. A pesar de que no se muestra en esta figura, el primer socio de unión al analito 102 podría estar, como alternativa, ubicado aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. Un socio de unión 107 para un segundo socio de unión al analito 103 está conjugado a una enzima 108, y está ubicado aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. Como alternativa, el socio de unión 107 para el segundo socio de unión al analito 103 se podría solapar con la zona de aplicación de muestra 44 o estar ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 está, preferiblemente, embebida con el segundo socio de unión al analito 103 conjugado a un primer marcador detectable 104 y se mezcla preferiblemente con un segundo socio de unión de control 105 conjugado a un segundo marcador detectable 106, que sirve como control.

A pesar de que la figura 14 muestra los diferentes reactivos en ciertas ubicaciones sobre la tira reactiva o el compresor de muestras 30, también son posibles otras ubicaciones para cada uno del primer socio de unión al analito 102 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 101, el socio de unión 107 para el segundo socio de unión al analito 103, el segundo socio de unión al analito conjugado al primer marcador detectable 104, y el segundo socio de unión de control 105 conjugado al segundo marcador detectable 106 sobre la tira reactiva y/o sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. Otras realizaciones no requieren un compresor de muestras 30. En las presentes realizaciones, los reactivos 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 y 108 estarán ubicados en diversas ubicaciones, preferiblemente aguas arriba de la zona de prueba 45, sobre la tira reactiva.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justamente sobre la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferiblemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15 - 30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 15A y 15B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, se compleja con el primer socio de unión al analito 102 y el segundo socio de unión al analito 103, que se compleja con el socio de unión 107 conjugado con la enzima 108.

Si el analito 40 no se encuentra presente en la muestra, el segundo socio de unión al analito 103 aún se compleja con el socio de unión 107 conjugado con la enzima 108, pero estos no se complejan con la muestra o el primer socio de unión al analito 102. El segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 101 se unirá al primer socio de unión a la zona de prueba 109 en la zona de prueba 45, independientemente de si el analito 40 está o no presente en la muestra. No obstante, si no hay analito presente, nada será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si se forma una línea de prueba visible junto con una línea de

control visible, el resultado indica niveles elevados de analito en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea visible en la línea de prueba, entonces una gota de un sustrato para la enzima se añade en la línea de prueba. Si la adición del sustrato enzimático da como resultado una señal visible, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea visible en la línea de control indica que el segundo socio de unión de control 105 conjugado a la segundo marcador detectable 106 se ha unido al primer socio de unión de control 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. La figura 15C muestra el complejo que se forma en la zona de control.

Como un ejemplo, un detector del virus del herpes simple (VHS) incluye las siguientes secciones, tal como se muestra en la figura 14. La zona de control 46 incluye anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo inmovilizado 110. La zona de prueba 45 incluye NeutrAvidina inmovilizada 109 sobre la membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS-1 y/o VHS-2 102 se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44. A pesar de que no se muestra en esta figura, el anticuerpo anti-VHS-1/VHS-2 102 podría secarse, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (H&L) 107 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) 108 se seca aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. Como alternativa, el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 107 conjugado a peroxidasa de rábano picante 108 se podría solapar con la zona de aplicación de muestra 44 o estar ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 está, preferiblemente, embebida con anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 103 (anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína D del virus del herpes simple) conjugado a oro coloidal 104 y mezclada con IgY de pollo 105 conjugada a perlas de látex teñidas de color azul 106, que sirve como control.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferiblemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15 - 30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 15A y 15B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el VHS (el analito 40) se encuentra presente en la muestra, se compleja con el anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS1/2 102 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 103 conjugado a oro coloidal 104, que se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 107 conjugado con HRP 108.

Si el VHS no se encuentra presente en la muestra, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 103 conjugado a oro coloidal 104 aún se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 107 conjugado con HRP 108, pero estos no se complejan con la muestra o el anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS1/2 102. El anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS1/2 102 se unirá a neutravidina 109 en la zona de prueba 45, independientemente de si el VHS está o no presente en la muestra. No obstante, si no hay VHS presente, el anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS 1/2 102 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si una línea de prueba de color rojo visible se forma junto con la línea de control de color azul, el resultado indica niveles elevados de VHS en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea de color rojo visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático TMBM (u otro sustrato para peroxidasa de rábano picante) se añade en la línea de prueba. Si la adición del TMBM da como resultado una línea de prueba de color azul / púrpura, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea de color azul en la línea de control indica que la IgY de pollo 105 conjugada a las perlas de látex teñidas de color azul 106 se ha unido al anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. La figura 15C muestra el complejo que se forma en la zona de control.

En la presente realización, la prueba de diagnóstico analítico inmediato se convierte en ligada a enzimas y la amplificación depende de la cantidad de enzima y sustrato, y se incrementa con el tiempo. Esto no ocurre en conjugados marcados visualmente a nanopartículas como oro coloidal o microesferas como perlas de látex. Además, el resultado de la línea de prueba no se debe a inmunoensayo antígeno-anticuerpo alguno, sino a un ensayo de unión entre un ligando y un receptor tal como neutravidina y biotina. La unión en la línea de prueba no es debida a unión inmunológica sino a unión química. Por lo tanto, esto no es un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA o EIA). En su lugar, es una cromofiltografía ligada a enzimas, o cromofiltografía enzimática de múltiples planos directa cuando se usa con un compresor de muestras. Incluso con una etapa adicional de añadir el sustrato enzimático a la línea de prueba, la prueba sigue siendo sencilla de realizar.

En una realización de apilamiento alternativa, mostrada en las figuras 16, 17A, y 17B, una enzima está unida físicamente al marcador detectable sobre tanto el conjugado como el resto de apilamiento. En un ejemplo, la enzima reviste perlas detectables visiblemente (por ejemplo, perlas de látex de color rojo) y está conjugada a un anticuerpo de conejo anti-ratón. A pesar de que la peroxidasa de rábano picante se usa a menudo para amplificar una señal débil, se podrían usar, como alternativa, otras enzimas que intensifican señales débiles incluyendo, pero sin limitarse a, fosfatasa alcalina, catalasa, ureasa y glucosa oxidasa. Análogamente, se podrían usar como alternativa otros anticuerpos que se unen al conjugado o un intermediario. No hay nanopartículas o microesferas en la presente realización. En su lugar, la presente realización incluye una forma "soluble" del conjugado. La ubicación en la que se seca este conjugado enzimático puede variar; se puede encontrar aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de muestra. En algunas realizaciones con un compresor de muestras, el conjugado enzimático

podría estar, como alternativa, sobre el compresor de muestras. El conjugado enzimático se seca, preferiblemente, sobre la tira reactiva, pero no se inmoviliza. Puede estar ubicado en solitario o en combinación con otros componentes que forman el "sándwich" con el anticuerpo que está, preferiblemente, biotinilado.

5 La figura 16 muestra una realización de un detector con una enzima unida físicamente al marcador detectable sobre tanto el conjugado como el resto de apilamiento. La zona de control 46 incluye un primer socio de unión de control inmovilizado 110, de forma similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye un primer socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 209 sobre una membrana. Un primer socio de unión al analito 202 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201 se seca o se incorpora de otro modo (por ejemplo, se liofiliza) en la zona de aplicación de muestra 44. A pesar de que no se muestra en esta figura, el primer socio de unión al analito 202 podría estar ubicado, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44.

15 Un socio de unión 207 para un segundo socio de unión al analito 203, que está conjugado a una enzima 208 y conjugado a un marcador detectable 215 (que también está conjugado a la enzima 208), está preferiblemente embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones, hay solo un socio de unión 207 para el segundo socio de unión al analito 203 conjugado a un marcador detectable 215, y el marcador detectable también está conjugado a la enzima 208. En algunas realizaciones, la enzima 208 está conjugada al marcador detectable 215 revistiendo el marcador detectable 215. En algunas realizaciones, el socio de unión 207 conjugado a la enzima 208 más el socio de unión 207 conjugado al marcador detectable 215 (que también está conjugado a la enzima 208) podría estar ubicado sobre la tira reactiva, solapándose con la zona de aplicación de muestra 44 o estando ubicado aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también está preferiblemente embebida con el segundo socio de unión al analito 203 conjugado a un marcador detectable 204 revestido con la enzima 208 que, preferiblemente, se mezcla con un segundo socio de unión de control 105 conjugado a un marcador detectable 106 (mostrado en la figura 14), que sirve como control.

30 A pesar de que la figura 16 muestra los diferentes reactivos en ciertas ubicaciones sobre la tira reactiva o el compresor de muestras 30, otras ubicaciones para cada uno del primer socio de unión al analito 202 conjugado al segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201, el socio de unión 207 conjugado a la enzima 208 más el socio de unión 207 conjugado al marcador detectable 215 revestido con la enzima, y el segundo socio de unión de control 105 conjugado al marcador detectable 106, sobre la tira reactiva y/o sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30 también son posibles. Otras realizaciones no requieren un compresor de muestras 30. En las presentes realizaciones, los reactivos 201, 202, 203, 204, 105, 106, 207, 208 y 215 estarán ubicados en diversas ubicaciones, preferiblemente aguas arriba de la zona de prueba 45, sobre la tira reactiva.

40 La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferiblemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15 - 30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 17A a 17B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, se compleja con el primer socio de unión al analito 202 y el segundo socio de unión al analito 203. El segundo socio de unión al analito también se compleja con el socio de unión 207.

50 Si el analito 40 no se encuentra presente en la muestra, el segundo socio de unión al analito 203 aún se compleja con el socio de unión 207, pero estos no se complejan con la muestra o el primer socio de unión al analito 202. El segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201 se unirá al primer socio de unión a la zona de prueba 209 en la zona de prueba 45, independientemente de si el analito 40 está o no presente en la muestra. No obstante, si no hay analito 40 presente, el segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201 conjugado al primer socio de unión al analito 202 y complejado con el primer socio de unión a la zona de prueba 209 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si se forma una línea de prueba visible junto con una línea de control visible, el resultado indica niveles elevados de analito en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático se añade en la línea de prueba. Si la adición del sustrato enzimático da como resultado una línea de prueba visible, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea visible en la línea de control indica que el segundo socio de unión de control 105 se ha unido al primer socio de unión de control 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

60 En la presente realización, la enzima está unida físicamente al marcador detectable (por ejemplo, perlas de látex) y se mueve con el marcador detectable. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea visible. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas. Depositando muchos de los reactivos, incluyendo el socio de unión 207, que incluye la enzima 208 y el marcador detectable 215, sobre el compresor de muestras, estos reactivos no se encuentran sobre

la tira. En algunas realizaciones preferidas, el segundo socio de unión al analito 203 se puede mezclar previamente con el socio de unión 207 (con o sin el socio de unión marcado con enzimas) y estar embebido en la almohadilla de compresor de muestras. En las presentes realizaciones, la tira reactiva incluye el segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 202, que se une al primer socio de unión a la zona de prueba 209. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

Como un ejemplo, un detector del virus del herpes simple (VHS) incluye las siguientes secciones, tal como se muestra en la figura 16. La zona de control 46 incluye un anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo inmovilizado 110, de forma similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye NeutrAvidina inmovilizada 209 sobre la membrana de nitrocelulosa. Un anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS-1 y/o VHS-2 202 se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44. A pesar de que no se muestra en esta figura, el anticuerpo anti-VHS-1/VHS-2 202 podría secarse, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (H&L) 207 conjugado a perlas de látex de color rojo 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante y está preferiblemente embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones, solo existe anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a perlas de látex de color rojo 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante. Como alternativa, el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a peroxidasa de rábano picante 208 más anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a perlas de látex de color rojo 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante podría estar ubicado sobre la tira reactiva, que se solapa con la zona de aplicación de muestra 44 o que está ubicado aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 está, preferiblemente, también embebida con anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 203 (anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína D del virus del herpes simple) conjugado a perlas de látex de color rojo 204 revestidas con peroxidasa de rábano picante y mezclado con IgY de pollo 105 conjugada a perlas de látex teñidas de color azul 106 (mostradas en la figura 14), que sirve como control.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge preferiblemente en tampón de migración durante aproximadamente 15 - 30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 17A y 17B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el VHS (el analito 40) se encuentra presente en la muestra, se compleja con el anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS1/2 202 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 203 conjugado a perlas de látex de color rojo 204, que se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado con HRP 208 y el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a perlas de látex de color rojo 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante.

Si el VHS no se encuentra presente en la muestra, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 203 conjugado a las perlas de látex de color rojo 204 aún se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207, pero estos no se complejan con la muestra o el anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS1/2 202. El anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS1/2 202 se unirá a NeutrAvidina 209 en la zona de prueba 45, independientemente de si el VHS está o no presente en la muestra. No obstante, si no hay VHS presente, el anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS 1/2 202 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si una línea de prueba de color rojo visible se forma junto con la línea de control de color azul, el resultado indica niveles elevados de VHS en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea de color rojo visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático TMBM (u otro sustrato para peroxidasa de rábano picante) se añade en la línea de prueba. Si la adición del TMBM da como resultado una línea de prueba de color azul / púrpura, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea de color azul en la línea de control indica que la IgY de pollo 105 conjugada a las perlas de látex teñidas de color azul 106 se ha unido al anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

En este ejemplo, anticuerpo de conejo anti-ratón se conjuga a la enzima, que también se conjuga a las perlas de látex de color rojo, un anticuerpo de conejo anti-ratón adicional se conjuga directamente a las mismas perlas. La enzima está unida físicamente a las perlas y se mueve con las perlas. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea de color rojo. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas.

Al depositar el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a las perlas de color rojo (junto con el conjugado enzimático sobre la misma perla) sobre el compresor de muestras, estos reactivos no se encuentran sobre la tira. En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 libre se puede mezclar previamente con el anticuerpo de conejo anti-ratón (con o sin el anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con enzimas) y embeberse en la almohadilla de compresor de muestras. En las presentes realizaciones, la tira reactiva incluye biotina que se une a neutravidina. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

Las figuras 18, 19A, y 19B muestran otra realización de apilamiento de la presente invención. En la presente realización, una enzima se conjuga / se une físicamente a un marcador detectable sobre el resto de apilamiento y el conjugado que se une al analito no incluye un marcador detectable. La presente realización incrementa adicionalmente la especificidad. En un ejemplo, la enzima reviste perlas detectables visiblemente (por ejemplo, perlas de látex de color rojo) y se conjuga a un anticuerpo de conejo anti-ratón. A pesar de que a menudo se usa peroxidasa de rábano picante para amplificar una señal débil, se podrían usar, como alternativa, otras enzimas que intensifican señales débiles incluyendo, pero sin limitarse a, fosfatasa alcalina, catalasa, ureasa y glucosa oxidasa. Análogamente, se podrían usar como alternativa otros anticuerpos que se unen al conjugado o un intermediario. No hay nanopartículas o microsferas en la presente realización. En su lugar, la presente realización incluye una forma "soluble" del conjugado. La ubicación en la que se seca este conjugado enzimático puede variar; se puede encontrar aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de muestra. En algunas realizaciones con un compresor de muestras, el conjugado enzimático podría estar, como alternativa, sobre el compresor de muestras. El conjugado enzimático se seca, preferiblemente, sobre la tira reactiva, pero no se inmoviliza. Puede estar ubicado en solitario o en combinación con otros componentes que forman el "sándwich" con el anticuerpo (que está, preferiblemente, biotinilado).

Una realización de un detector con enzima conjugada / unida físicamente a un marcador detectable sobre el resto de apilamiento y un conjugado que se une al analito que no incluye un marcador detectable se muestra en la figura 18. La zona de control 46 incluye un primer socio de unión de control inmovilizado 110, de forma similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye un primer socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 309 sobre una membrana. Un primer socio de unión al analito 302 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 301 se seca o se incorpora de otra manera (por ejemplo, se liofiliza) en la zona de aplicación de muestra 44. A pesar de que no se muestra en esta figura, el primer socio de unión al analito 302 podría estar, como alternativa, ubicado aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. Una mezcla de un socio de unión 307 para el segundo socio de unión al analito 303 conjugado a una enzima 308 y el socio de unión 307 conjugado a un marcador detectable 315 (por ejemplo, perlas de látex) revestidas o conjugadas de otro modo a la enzima 308 está, preferiblemente, embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones, solo existe el socio de unión 307 conjugado al marcador detectable 315, que también se conjuga a la enzima 308 (por ejemplo, mediante la enzima que reviste las perlas de látex). A pesar de que el socio de unión 307 conjugado a la enzima y el socio de unión 307 conjugado al marcador detectable 315 revestido con la enzima se muestra sobre el compresor de muestras 30 en esta figura, estos componentes podrían estar, como alternativa, ubicados sobre la tira reactiva, solapándose con la zona de aplicación de muestra 44 o estando ubicados aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también está, preferiblemente, embebida con un segundo socio de unión al analito 303. A diferencia de en las realizaciones anteriores, el segundo socio de unión al analito 303 no está conjugado a un marcador detectable o una enzima. En algunas realizaciones, el segundo socio de unión al analito 303 se mezcla, preferiblemente, con el segundo socio de unión de control 105 conjugado al marcador detectable 106 (mostrada en la figura 14), que sirve como control.

A pesar de que la figura 18 muestra los diferentes reactivos en ciertas ubicaciones sobre la tira reactiva o el compresor de muestras 30, también son posibles otras ubicaciones para cada uno del primer socio de unión al analito 302 conjugado al segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 301, la mezcla del socio de unión 307 para el segundo socio de unión al analito 303 conjugado a una enzima 308 y el socio de unión 307 conjugado a un marcador detectable 315 revestido o conjugado de otro modo a la enzima 308, el segundo socio de unión al analito 303 y el segundo socio de unión de control 105 conjugado a un marcador detectable 106, sobre la tira reactiva y/o sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. Otras realizaciones no requieren un compresor de muestras 30. En las presentes realizaciones, los reactivos 301, 302, 303, 304, 105, 106, 307, 308 y 315 estarán ubicados en diversas ubicaciones, preferiblemente aguas arriba de la zona de prueba 45, sobre la tira reactiva.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge preferiblemente en tampón de migración durante aproximadamente 15 - 30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 19A y 19B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, se compleja con el primer socio de unión al analito 302 y el segundo socio de unión al analito 303. El segundo socio de unión al analito 303 también se compleja con el socio de unión 307.

Si el analito 40 no se encuentra presente en la muestra, el segundo socio de unión al analito 303 aún se compleja con el socio de unión 307, pero estos no se complejan con la muestra o el primer socio de unión al analito 302. El segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 301 se une al primer socio de unión a la zona de prueba 309 en la zona de prueba 45, independientemente de si el analito está o no presente en la muestra. No obstante, si no hay analito 40 presente, el complejo resultante no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si se forma una línea de prueba visible junto con la línea de control visible, el resultado indica niveles elevados de analito 40 en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna

línea visible en la línea de prueba, entonces una gota de un sustrato enzimático se añade en la línea de prueba. Si la adición del sustrato enzimático da como resultado una línea de prueba visible, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea visible en la línea de control indica que el segundo socio de unión de control 105 conjugado al marcador detectable 106 se ha unido al primer socio de unión de control 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

En la presente realización, el socio de unión 307 se conjuga a la enzima 308, que también se conjuga al marcador detectable 315 (por ejemplo, perlas de látex), y un socio de unión adicional 307 se conjuga directamente al mismo marcador detectable 315. La enzima está unida físicamente al marcador detectable y se mueve con el marcador detectable. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea visible. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas.

Al depositar el socio de unión 307 y sus otros componentes (308 y 315) sobre el compresor de muestras, estos reactivos no se encuentran sobre la tira. En algunas realizaciones preferidas, el segundo socio de unión al analito 303 se puede mezclar previamente con el socio de unión 307 (con o sin el socio de unión marcado con enzimas 307) y embeberse en la almohadilla de compresor de muestras. En las presentes realizaciones, el dispositivo incluye socios de unión tales como biotina y avidina. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

Como un ejemplo, un detector del virus del herpes simple (VHS) incluye las siguientes secciones, tal como se muestra en la figura 18. La zona de control 46 incluye anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo inmovilizado 110, de forma similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye NeutrAvidina inmovilizada 309 sobre una membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS-1 y/o VHS-2 302 se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44. A pesar de que no se muestra en esta figura, el anticuerpo anti-VHS-1/VHS-2 302 podría estar ubicado, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra. Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (H&L) 307 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) 308 más anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex de color rojo 315 revestidas con peroxidasa de rábano picante está preferiblemente embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras. En otras realizaciones, solo hay anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex de color rojo 315 revestidas con peroxidasa de rábano picante. Como alternativa, el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a peroxidasa de rábano picante 308 más anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex de color rojo revestidas con peroxidasa de rábano picante 308 podrían estar ubicados sobre la tira reactiva, solapándose con la zona de aplicación de muestra 44 o estando ubicados aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44. La almohadilla sobre el compresor de muestras 30 también está, preferiblemente, embebida con anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 libre 303. A diferencia de en las realizaciones anteriores, los anticuerpos monoclonales de ratón libres 303 no están conjugados a un marcador detectable o una enzima. Los anticuerpos monoclonales de ratón libres 303 se mezclan preferiblemente con IgY de pollo 105 conjugada a perlas de látex teñidas de color azul (mostradas en la figura 14), que sirve como control.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferiblemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15 - 30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 19A y 19B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el VHS (el analito 40) se encuentra presente en la muestra, se compleja con el anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS1/2 302 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1 & 2 303, que se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado con HRP 308 y el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex de color rojo 315 revestidas con peroxidasa de rábano picante.

Si el VHS no se encuentra presente en la muestra, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 303 aún se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307, pero estos no se complejan con la muestra o el anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS1/2 302. El anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS1/2 202 se unirá a neutravidina 309 en la zona de prueba 45, independientemente de si el VHS está o no presente en la muestra. No obstante, si no hay VHS presente, el anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS 1/2 302 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si una línea de prueba de color rojo visible se forma junto con la línea de control de color azul, el resultado indica niveles elevados de VHS en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea de color rojo visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático TMBM (u otro sustrato para peroxidasa de rábano picante) se añade en la línea de prueba. Si la adición del TMBM da como resultado una línea de prueba de color azul / púrpura, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea de color azul en la línea de control indica que la IgY de pollo 105 conjugada a las perlas de látex teñidas de color azul 106 se ha unido al anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

En este ejemplo, el anticuerpo de conejo anti-ratón se conjuga a la enzima, que también se conjuga a las perlas de látex de color rojo, y el anticuerpo de conejo anti-ratón adicional se conjuga directamente a las mismas perlas. La enzima está unida físicamente a las perlas y se mueve con las perlas. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea de color rojo. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas.

Al depositar el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a las perlas de color rojo (junto con el conjugado enzimático sobre la misma perla) sobre el compresor de muestras, estos reactivos no se encuentran sobre la tira. En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 libre se puede mezclar previamente con el anticuerpo de conejo anti-ratón (con o sin el anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con enzimas) y embeberse en la almohadilla de compresor de muestras. En las presentes realizaciones, el dispositivo incluye socios de unión tales como biotina y avidina. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

En algunas realizaciones preferidas, la nitrocelulosa está “bloqueada” con bloqueantes, lo que incrementa la especificidad de la reacción. Algunos ejemplos para bloqueantes incluyen, pero sin limitarse a, caseína y albúmina de suero bovino (BSA). En cuanto se bloquea la membrana de nitrocelulosa, la carga inherente de la nitrocelulosa se neutraliza y, por lo tanto, ninguna proteína adicional se puede unir a la membrana bloqueada. Además, la estructura cromatográfica se cambia y el flujo es más como un flujo deslizante o resbaladizo en lugar de cromatografía tradicional. El resultado es un proceso de cromofiltrografía único.

La figura 21A muestra otra realización de una tira reactiva de flujo lateral con elementos intensificadores. La presente realización preferiblemente incluye un socio de unión marcado 407 que es específico para una especie en lugar de un analito 40. Como un ejemplo, cuando el socio de unión 402 para el analito es un anticuerpo de ratón, el socio de unión específico de especie marcado 407 es un anticuerpo anti-ratón. Como otro ejemplo, cuando el socio de unión 402 para el analito es un anticuerpo de conejo, el socio de unión específico de especie marcado 407 es un anticuerpo anti-conejo. Los expertos en la materia entenderían que cualquier socio de unión específico de especie 407, u otro socio de unión no específico para el analito 40 pero específico para un socio de unión 402 para el analito, se podría usar en la presente realización. Los expertos en la materia también sabrían cómo seleccionar especies para reducir al mínimo reacciones cruzadas.

La zona de aplicación de muestra 44 incluye un primer socio de unión 402 para el analito 40. Nótese que el primer socio de unión 402 no incluye un marcador detectable. En la presente realización, parte del primer socio de unión 402 está preferiblemente marcada 401 y un socio de unión 409 para la marca 401 está preferiblemente marcado con un marcador detectable. En algunas realizaciones preferidas, la cantidad del primer socio de unión 402 que está marcado 401 es del 1 - 10 % de la cantidad total del primer socio de unión 402 en la prueba.

La zona de aplicación de muestra 44 también incluye un socio de unión específico de especie marcado 407 (conjugado a un marcador detectable 417) que se une al primer socio de unión 402 debido a la especie del primer socio de unión 402. La zona de aplicación de muestra 44 también incluye, preferiblemente, un socio de unión de control 405 marcado 415. A pesar de que el primer socio de unión 402 para el analito 40, el conjugado que incluye un marcador visible 417 y un socio de unión específico de especie 407, y el conjugado de control 405 conjugado a un marcador visible 415 se muestran en la zona de aplicación de muestra 44 en esta figura, cualquier combinación de estos elementos puede estar ubicada en otras ubicaciones sobre la tira reactiva (aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de muestra) o sobre un compresor de muestras 30, tal como se ha descrito en algunas realizaciones anteriores.

La zona de prueba 45 incluye un segundo socio de unión inmovilizado 427 para el analito 40. La zona de control 46 incluye un socio de unión inmovilizado 420 para el socio de unión de control 405. La zona de prueba 45 y la zona de control 46 están, preferiblemente, ubicadas sobre una membrana de nitrocelulosa.

Cuando una muestra que incluye analito 40 se añade a la tira reactiva, el primer socio de unión 402 se une al analito 40 y forma “medio sándwich”. Esto se produce preferiblemente sin flujo sobre la tira reactiva. Cuando se aplica tampón de migración, éste moviliza el “medio sándwich”. El tampón de migración también moviliza al socio de unión específico de especie 407. Durante el flujo, el socio de unión específico de especie 407 interactúa con y se une al primer socio de unión 402 en el medio sándwich. Debido a múltiples sitios de unión sobre el primer socio de unión 402, existe un efecto de agregación o apilamiento que intensifica la detección del analito 40. En la zona de prueba 45, el analito 40, que es ahora parte de un complejo agregado o apilado, se une al segundo socio de unión inmovilizado 427 para formar el sándwich completo. El resultado es una señal visible intensificada formada en la zona de prueba 45. La unión entre el socio de unión de control 405 y el socio de unión de control inmovilizado 420 da como resultado una señal detectable 415.

En presencia del analito 40, la señal detectable 417 conjugada al socio de unión específico de especie 407 es parte del complejo y ha de ser visible. Si una línea de prueba visible es “leída” por el usuario, la prueba es registrada como un resultado positivo para la presencia del analito 40. Si la línea de prueba no es visible o es equivocada, entonces una o más gotas de un fluido que incluye un socio de unión a una marca 409 para la marca 401 conjugado a un

marcador detectable (por ejemplo, oro coloidal o perlas de látex) se añaden en la zona de prueba 45. El socio de unión a una marca 409 se une instantáneamente a la marca 401 sobre el primer socio de unión 402. Esto intensifica en gran medida la visibilidad de la línea de prueba en presencia del analito 40. En ausencia del analito, el socio de unión a una marca 409 se disipa y no hay ninguna línea de prueba visible.

5 La figura 21B muestra un complejo apilado en la línea de prueba cuando el analito 40 se encuentra presente en la muestra. La figura 21C muestra el complejo apilado con la adición de las marcas 401 y 409.

10 En un ejemplo de la realización mostrada en las figuras 21A a 21C para detectar el virus del herpes simple (VHS), la zona de aplicación de muestra 44 incluye anticuerpo para gD 1&2 de VHS de ratón libre 402 (que se une a VHS), así como algo de anticuerpo para gD1&2 de VHS de ratón 402 biotinilado 401. En una realización preferida, aproximadamente 1 - 10 % del anticuerpo para gD1&2 de VHS libre 402 está biotinilado 401.

15 La zona de aplicación de muestra 44 también incluye anticuerpo de conejo anti-ratón 407 conjugado a perlas de látex de color rojo 417 y un anticuerpo para IgY de pollo de control 405 conjugado a perlas de látex de color azul 415. Nótese que el anticuerpo de conejo anti-ratón 407 no es específico para un analito 40. En su lugar, se une específicamente al anticuerpo para gD1&2 de VHS de ratón 402. Tal como se ha descrito en lo que antecede, cualquiera del anticuerpo para gD1&2 de VHS 402, el anticuerpo para gD1&2 de VHS 402 biotinilado 401, el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a las perlas de látex de color rojo, el anticuerpo para IgY de pollo conjugado a perlas de látex de color azul, o cualquier combinación de estos elementos, puede estar, como alternativa, aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de muestra 44, o estar incluido sobre un compresor de muestras 30 en algunas realizaciones en las que se usa un compresor de muestras 30. La zona de prueba 45 incluye anticuerpo de conejo anti-VHS inmovilizado 427, que se une al analito VHS 40 cuando se encuentra presente en la muestra. La zona de control 46 incluye anticuerpo de conejo anti-IgG de pollo / conejo inmovilizado 420. La zona de prueba 45 y la zona de control 46 están ubicadas, preferiblemente, sobre una membrana de nitrocelulosa.

30 Cuando una muestra que incluye el analito 40 se añade a la tira reactiva, el anticuerpo para gD1&2 de VHS 402 se une al analito VHS 40 y forma "medio sándwich". Esto se produce sin flujo sobre la tira reactiva. Cuando se aplica tampón de migración, moviliza el "medio sándwich". El tampón de migración también moviliza el anticuerpo de conejo anti-ratón 407. Durante el flujo, el anticuerpo de conejo anti-ratón 407 interactúa con y se une al anticuerpo para gD1&2 de VHS 402 en el medio sándwich. Debido a múltiples sitios de unión sobre el anticuerpo de ratón 402, existe un efecto de agregación o apilamiento que intensifica la detección del analito 40. En la zona de prueba 45, el analito complejo agregado o apilado 40, que es ahora parte de un complejo agregado o apilado, se une al anticuerpo de conejo anti-VHS inmovilizado 427 para formar el sándwich completo. El resultado es una señal visible intensificada que se forma en la zona de prueba 45. La unión se produce entre el conjugado a IgY de pollo de control 405 y el anticuerpo de conejo anti-IgG de pollo / conejo inmovilizado 420, dando como resultado un marcador detectable de color azul 415.

40 En presencia del analito 40, las perlas de látex de color rojo 417 conjugadas al anticuerpo de conejo anti-ratón 407 son parte del complejo y han de ser visibles. Si una línea de prueba visible es "leída" por el usuario, la prueba se registra como un resultado positivo para la presencia del analito 40. Si la línea de prueba no es visible o es equívoca, entonces una gota de avidina, neutravidina o estreptavidina conjugada 409 a oro coloidal o perlas de látex se añade en la zona de prueba 45. El conjugado de avidina, neutravidina o estreptavidina 409 se une instantáneamente a la biotina 401 sobre el anticuerpo para gD1&2 de VHS 402. Esto intensifica en gran medida la visibilidad de la línea de prueba en presencia del analito 40. En ausencia del analito, el conjugado a avidina, estreptavidina o neutravidina 409 se disipa y no hay ninguna línea de prueba visible.

50 En algunas realizaciones, en lugar de una membrana de nitrocelulosa, se pueden usar membranas tales como de nailon o poliéster que son neutras. En las presentes realizaciones, las proteínas tales como neutravidina, anticuerpos y antígenos no están inmovilizadas directamente. En su lugar, están conjugadas a microesferas que se "depositan" en la membrana y se mantienen en sus grietas. A pesar de que se muestra el uso de una membrana neutra con respecto a la presente realización particular, se podrían usar, como alternativa, membranas neutras y microesferas depositadas sobre esas membranas, en otras realizaciones de la presente invención.

55 La figura 13 muestra algunas ubicaciones preferidas de materiales de intensificación de señales tanto para intensificación con plata como apilamiento en algunas realizaciones de dispositivos de flujo lateral de la presente invención. La figura 13 muestra de forma esquemática dos opciones para la ubicación de la zona de detección, y en la figura se muestran solo los elementos específicos para la intensificación de señales.

60 En algunas realizaciones con intensificación con plata, la sal de plata 70 está ubicada preferiblemente en una zona 90 entre la zona de aplicación de muestra 44 y la zona de prueba 45 para permitir que al menos parte del sándwich se forme antes de la unión a la sal de plata. Como alternativa, la sal de plata 70 se puede colocar sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, en la zona de aplicación de muestra 44, en una zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44, en el tampón de migración 43 o directamente sobre la zona de prueba 45 después de que el ensayo se ha realizado. En algunas realizaciones, el agente de revelado de plata 71 también está

ubicado en la zona 90 entre la zona de aplicación de muestra y la zona de prueba. En otras realizaciones, el agente de revelado de plata 71 está ubicado en la zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44, en el tampón de migración 43, sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, o directamente sobre la zona de prueba 45 después de que el ensayo se ha realizado.

En algunas realizaciones con apilamiento, el primer conjugado 72 puede estar ubicado sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, en la zona de aplicación de muestra 44, en una zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44, o en una zona 90 aguas abajo de la zona de aplicación de muestra. Como alternativa, el primer conjugado 72 se puede mezclar previamente con la muestra antes de la aplicación a la zona de aplicación de muestra; en la presente realización, el medio sándwich se forma fuera del dispositivo de ensayo. El segundo conjugado 74 está ubicado, preferiblemente, en una zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de muestra. Como alternativa, el segundo conjugado 74 puede estar ubicado sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. Como alternativa, el segundo conjugado 74 puede estar en una ubicación en la que se puede retardar su alcance del primer conjugado 72, incluyendo, pero sin limitarse a, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, aguas arriba del conjugado o añadirse en un momento después de que el ensayo ha comenzado, tal como en el tampón de migración o directamente en la zona de prueba. A pesar de que no se prefiere, cualquiera o ambos del primer conjugado 72 o el segundo conjugado 74 podrían estar, como alternativa, ubicados en el tampón de migración 43 (que no se muestra).

En algunas realizaciones, la amplificación de señal puede incluir uno o más componentes retardados en el tiempo encapsulados. Por ejemplo, uno cualquiera o ambos de los componentes de intensificación de plata 70, 71 se pueden encapsular, tal como se muestra en las figuras 22A a 22C. En otra realización, el conjugado de apilamiento 74 se puede encapsular, tal como se muestra en la figura 23B. En aún otra realización, tanto el conjugado de apilamiento 74 como uno cualquiera o ambos de los componentes de intensificación de plata 70, 71 se pueden encapsular. Cualquiera de los elementos de intensificación de señal que se describen en las figuras 11 - 21 se puede encapsular. En otras realizaciones, cualquiera de los componentes del ensayo de flujo lateral se podría encapsular, para proporcionar un retardo de tiempo. Por ejemplo, el primer conjugado 72 se muestra como encapsulado en la figura 23A. A pesar de que no se prefiere la encapsulación del primer conjugado 72, esta figura representa la posibilidad de encapsular cualquiera de los componentes del ensayo, para crear un retardo de tiempo.

Los componentes encapsulados preferiblemente se pulverizan o se secan sobre la tira reactiva, a pesar de que también son posibles otros métodos de colocación sobre la tira reactiva. En algunas realizaciones preferidas, se colocan elementos de intensificación encapsulados en la línea de prueba, o justo aguas arriba de la línea de prueba, a pesar de que también son posibles otras ubicaciones sobre la tira reactiva.

La plata 70 y/o el agente de revelado 71 se encapsulan y se colocan sobre el dispositivo de flujo lateral, preferiblemente o bien en forma seca o bien en solución. La plata encapsulada 70 y/o el agente de revelado encapsulado 71 están preferiblemente incorporados en, pero no inmovilizados sobre, el dispositivo de flujo lateral. El material de encapsulación 600 se disuelve mediante el tampón de migración, preferiblemente después de aproximadamente 5 minutos, liberando de ese modo la plata después de que se haya formado el sándwich completo en la línea de prueba. En otra realización, la matriz de encapsulación 600 puede contener unos "sustratos" estratégicamente ubicados tales como péptidos sobre los cuales las proteasas pueden actuar y escindir, haciendo de este modo orificios en la matriz. Estas proteasas o agentes "líticos" se pueden encontrar en el tampón de migración. En lugar de proteasas, hay agentes líticos tales como sales que se acumulan lentamente y rompen de forma selectiva la matriz de encapsulación 600. La liberación de los componentes encapsulados (liberación temporalizada o liberación retardada) es o bien por la disolución lenta del material de encapsulación 600 o bien por "orificios de perforación" en la matriz de encapsulación 600 a través de los cuales las partículas o reactivos encapsulados escapan lentamente y fluyen hacia la línea de prueba en la que ya se ha formado o se está formando el sándwich. Asimismo, en algunas realizaciones, algunos o la totalidad de los componentes retardados en el tiempo "se apilan" sobre el complejo de sándwich antes de que el complejo de sándwich se una a la línea de prueba y quede inmovilizado.

En algunas realizaciones, tanto la plata 70 como el agente de revelado 71 se pueden encapsular de forma conjunta, tal como se muestra en la figura 22C. En las presentes realizaciones, la plata 70 y el agente de revelado 71 están preferiblemente separados como glóbulos independientes dentro de la encapsulación 600. Los glóbulos se pueden romper a diferentes tasas. Por lo tanto cuando se rompe la encapsulación 600, un glóbulo incluye la sal de plata 70 y un glóbulo separado incluye el agente de revelado 71. El glóbulo que incluye el agente de revelado 71 se puede romper a una velocidad menor que la sal de plata 70, o viceversa. A modo de analogía, imagínese un globo que contiene diferentes canicas de colores. El globo se puede romper, permitiendo que escapen las diferentes canicas de colores. Un tipo de canica encapsula la sal de plata y otro tipo de canica, que se rompe más lento que la canica de sal de plata, encapsula el agente de revelado. En otras realizaciones, la plata y el agente de revelado se encapsulan por separado (véanse las figuras 22A y 22B), pero en la misma ubicación sobre la tira reactiva. En aún otras realizaciones, la plata 70 y el agente de revelado 71 se encapsulan por separado (véanse las figuras 22A y 22B) en diferentes ubicaciones sobre la tira reactiva. En otras realizaciones, se encapsula solo uno de la plata 70 (véase la figura 22A) o el agente de revelado 71 (véase la figura 22B).

De forma similar, el conjugado de apilamiento 74 se puede encapsular, tal como se muestra en la figura 23B, y colocarse sobre el dispositivo de flujo lateral o bien en forma seca o bien en solución. En algunas realizaciones con anticuerpos, antígenos, u otros conjugados para amplificar la señal (aumentar el apilamiento), se podría usar la encapsulación de estos componentes para la estructura de apilamiento secundaria. En algunas realizaciones preferidas, estos componentes, que en algunos ejemplos son anticuerpos o antígenos, preferiblemente se encapsulan en la línea de prueba, pero como alternativa pueden estar ubicados sobre otros lugares sobre la tira reactiva.

Cualquier componente de la tira reactiva, en particular aquellos que realizan operaciones secundarias (tales como amplificar señales) incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos, antígenos, péptidos y enzimas, se podría encapsular dentro del espíritu de la presente invención. Además, se podría usar encapsulación de elementos de intensificación en combinación con cualquiera de las realizaciones que se divulgan en el presente documento.

En la técnica se conocen métodos de encapsulación y microencapsulación. Algunos métodos de encapsulación incluyen, pero sin limitarse a, métodos de encapsulación física tales como extrusión centrífuga, encapsulación de núcleo de boquilla vibratoria, secado por pulverización o revestimiento de lecho fluido, o métodos de encapsulación química tales como coacervación, polimerización interfacial (policondensación interfacial o reticulación interfacial), polimerización *in situ* o polimerización matricial.

Como algunos ejemplos, la plata 70, el agente de revelado 71 y/o el conjugado de apilamiento 74 se pueden encapsular en diversas envolventes conformadas incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, perlas, microperlas, esferas, cristales y partículas. En algunas realizaciones preferidas, se usan productos de encapsulación LipoTechnologies (LipoTechnologies, Inc., (Vandalia, OH)) (por ejemplo, productos de encapsulación Lipocrystal™, productos de encapsulación Liposphere™, productos de encapsulación Lipoparl™, productos de encapsulación Lipocapsule™, productos de encapsulación Lipobead™ y productos de encapsulación Lipoparticle™).

En algunas realizaciones, los materiales 600 que se usan para la encapsulación incluyen, pero sin limitarse a, celulosa o sílice. La celulosa actúa como una esponja, de tal modo que los componentes secados o húmedos (tales como plata) se podrían secar sobre la celulosa. Las presentes realizaciones difieren de aquellas en las que la plata 70, el agente de revelado 71 o los conjugados de apilamiento 74 se encapsulan en solución dentro de una esfera 610 u otra forma.

En otras realizaciones, los materiales que se usan para la encapsulación incluyen, pero sin limitarse a, mezclas de ésteres de colesterol, una matriz de polímero, una matriz de alginato, una matriz de agar, una matriz de gelatina, polioximetilén urea (PMU), metoximetil metilol melamina (MMM), lactosa, manitol, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, o cualquier combinación de estos materiales. En algunas realizaciones que usan productos Lipoparticle™, el material se puede encapsular en un sustrato, incluyendo, pero sin limitarse a, ciclodextrina, nailon poroso, materiales a base de sílice, o celulosa, y entonces encapsularse adicionalmente en otro recipiente de encapsulación. En las presentes realizaciones, los ejemplos de principios activos incluyen, pero sin limitarse a, ácido salicílico, tocoferol, mentol, triclosán, etilhexilo, metoxicinnamato y/o intensificadores de brillo óptico. En algunas realizaciones, el recipiente de encapsulación está pigmentado.

A pesar de que los métodos y dispositivos se describen en el presente documento como ensayos en sándwich, los métodos y dispositivos de la presente invención se pueden usar igualmente en ensayos competitivos. En estos ensayos competitivos, el conjugado preferiblemente incluye un analito o un análogo de analito, en lugar de un socio de unión del analito, que está unido a un marcador, o, como alternativa, el segundo socio de unión se sustituye con un analito o un análogo de analito. Un resultado de prueba positivo se indica entonces por la falta de la presencia del marcador en la zona de prueba de la tira reactiva.

Las figuras 24 y 25 muestran algunas realizaciones de dispositivos de flujo lateral con una zona de desvío 500 en algunas realizaciones preferidas de la presente invención.

Las figuras 24A y 24B muestran una realización con una zona de desvío 500 que incluye una barrera 510. El sistema incluye un compresor de muestras 30, un colector de muestras 535, y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). La tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de desvío 500, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva preferiblemente también incluye un sustrato de soporte 48. Tal como se muestra en las figuras 24A y 24B, en algunas realizaciones, la porción de recogida 560 del colector de muestras 535 es compacta, de tal modo que la misma concentra la muestra sobre el colector 560. La zona de desvío 500 incluye una barrera 510. En otras realizaciones, se podrían usar los colectores de muestras 35 que se muestran en las realizaciones previas. La barrera 510 es preferiblemente una membrana impermeable (o una membrana sustancialmente impermeable) que se puede fabricar de cualquier material que evite que el flujo de líquido continúe fluyendo en el mismo plano. Algunos materiales para la barrera incluyen, pero sin limitarse a, plásticos, hidrocarburos o metal.

En la presente realización, la totalidad del sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) se forma en la zona de aplicación de muestra 44. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una

marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en la presente realización se puede encontrar en cualquier parte sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, y entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección. De forma similar, la zona de aplicación de muestra 44 se puede encontrar aguas arriba de la zona de desvío 500, aguas abajo de la zona de desvío 500, o solapándose con o encima de la zona de desvío 500.

En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión de zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión de zona de control 61 se compleja con su socio de unión 110 en la zona de control 46 cuando la prueba se ha realizado correctamente.

La zona de desvío 500 detiene por completo el flujo hasta que el compresor de muestras 30 se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido, tal como se muestra por medio de la línea de puntos 520 en la figura 24B. El compresor de muestras 30 actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras 30. Esto aumenta la recogida del primer socio de unión 37 y el socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30. El fluido cambia de vuelta al plano lateral original en el extremo de la zona de desvío 500.

En otras realizaciones, el socio de unión de zona de control 61 podría estar ubicado sobre la tira reactiva, por ejemplo aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, sobre la zona de aplicación de muestra, o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra. En cualquiera de las realizaciones con un socio de unión de zona de control 61, el socio de unión de zona de control 61 no alcanzará la zona de control 46 a menos que el compresor de muestras 30 haya formado eficazmente el puente, permitiendo que el flujo continúe más allá de la barrera 510 (a medida que este se desplaza a través del compresor de muestras 30 en un plano alternativo) y entonces de vuelta sobre la tira reactiva.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión de zona de control 61 es también preferiblemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos frente al analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo que se muestra en la figura 24 se puede usar para cualquier ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión de ligando - receptor y ensayos de unión de enzima - sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferiblemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

Durante el funcionamiento, el colector de muestras 535 se coloca de tal modo que la muestra se encuentra directamente por encima de la zona de aplicación de muestra 44. La barrera 510 en la zona de desvío 500 detiene el flujo lateral 43 sobre la tira reactiva. Cuando se añade el compresor de muestras 30, este ejerce una presión 51 sobre el colector de muestras 535, y crea un puente por encima de la barrera 510. El fluido se desvía 520 hacia el compresor de muestras 30 en un plano separado. Cuando el medio de elución, la muestra o el tampón fluye a través del compresor de muestras 30, este recoge el primer socio de unión de analito 37 del conjugado 36 y el socio de unión de zona de control 61. El flujo se desplaza a través de la porción de recogida 560 del colector de muestras 535 a medida que este vuelve a la tira reactiva después del extremo de la barrera 510, en donde los componentes que se desplazan en el flujo interactúan con la muestra de interés. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, el analito 40 se une al primer socio de unión de analito 36 y el segundo socio de unión 38, creando un sándwich "vertical" con el conjugado 36 como la pieza de arriba y el segundo socio de unión 38 como la pieza de debajo, con el analito 40 entremedias de los mismos (véase la figura 4B). Si hay también un socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, también se transfiere el socio de unión de zona de control 61. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une entonces a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. La realización apropiada de la

prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión de zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

Obsérvese que, mientras que las figuras 24A y 24B muestran los reactivos en una configuración determinada (similar a la de las figuras 5A a 5B), los reactivos se pueden colocar en unas configuraciones alternativas, por ejemplo las configuraciones que se muestran en las figuras 1, 3, 4, 6, 8 y 9 con la adición de la barrera que se muestra en la figura 24. Además, la realización que se muestra en la figura 22 se podría usar en combinación con cualquiera de los elementos de intensificación o las realizaciones de encapsulación que se divulgan en el presente documento.

A pesar de que la barrera se muestra como una longitud específica en relación con el resto de la tira reactiva en las figuras 24A y 24B, las figuras son esquemáticas. La barrera 510 puede ser de cualquier longitud sobre la tira reactiva suficiente para detener el flujo y requerir que el compresor de muestras 30 vuelva a comenzar el flujo. La barrera 510 está diseñada para no ser tan larga como para obstruir el flujo de vuelta al interior del plano lateral en el extremo de aguas abajo del compresor de muestras 30.

En una realización preferida, la barrera 510 incluye componentes encapsulados. La barrera 510 en las presentes realizaciones se fabrica de un material que se disuelve con el tiempo (tal como se analiza en el presente documento), liberando los componentes encapsulados. La barrera 510 puede incluir cualquiera o la totalidad de los mismos reactivos que se han analizado en el presente documento como que se pueden encapsular. Una barrera que se está disolviendo 510 realiza unas funciones duales. De forma similar a las otras barreras 510, esta actúa como una pared para forzar el flujo al interior del compresor de muestras. Además, la misma retarda en el tiempo determinados componentes mediante la encapsulación de los mismos. El tampón o el medio de elución disuelve lentamente la barrera 510, y estos componentes retardados en el tiempo incidirán sobre el complejo de línea de prueba después de que los otros componentes del ensayo hayan alcanzado la línea de prueba.

Las figuras 25A y 25B muestran una zona de desvío 500 con una separación o surco 525. El sistema incluye un compresor de muestras 30, un colector de muestras 535, y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). La tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de desvío 500, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva preferiblemente también incluye un sustrato de soporte 48. Tal como se muestra en las figuras 25A y 23B, en algunas realizaciones, la porción de recogida 560 del colector de muestras 535 es compacta, de tal modo que la misma concentra la muestra sobre el colector 560. En otras realizaciones, se podrían usar los colectores de muestras 35 que se muestran en las realizaciones previas. La zona de desvío 500 incluye una separación 525. La separación 525 interrumpe el flujo al eliminar las membranas que permiten el flujo a lo largo de la tira reactiva.

En la presente realización, la totalidad del sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) se forma en la zona de aplicación de muestra 44. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en la presente realización se puede encontrar en cualquier parte sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, y entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección. De forma similar, la zona de aplicación de muestra 44 se puede encontrar aguas arriba de la zona de desvío 500, aguas abajo de la zona de desvío 500, o solapándose con o encima de la zona de desvío 500.

En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión de zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión de zona de control 61 se compleja con su socio de unión 110 en la zona de control 46 cuando la prueba se ha realizado correctamente.

La zona de desvío 500 detiene por completo el flujo hasta que el compresor de muestras 30 se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido, tal como se muestra por medio de la línea de puntos 520 en la figura 25B. El compresor de muestras 30 actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras 30. Esto aumenta la recogida del primer socio de unión 37 y el socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30. El fluido cambia de vuelta al plano lateral original en el extremo de la zona de desvío 500.

En otras realizaciones, el socio de unión de zona de control 61 podría estar ubicado sobre la tira reactiva, por ejemplo aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44, sobre la zona de aplicación de muestra 44, o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. En cualquiera de las realizaciones con un socio de unión de zona de control 61, el socio de unión de zona de control 61 no alcanzará la zona de control 46 a menos que el compresor de muestras 30 haya formado eficazmente el puente, permitiendo que el flujo continúe más allá de la separación (a

medida que este se desplaza a través del compresor de muestras 30 en un plano alternativo) y entonces de vuelta sobre la tira reactiva.

5 En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión de zona de control 61 es también preferiblemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos frente al analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo que se muestra en la figura 23 se puede usar para cualquier ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión de ligando - receptor y ensayos de unión de enzima - sustrato.

15 En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferiblemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

25 Durante el funcionamiento, el colector de muestras 535 se coloca de tal modo que la muestra se encuentra directamente por encima de la zona de aplicación de muestra 44. La separación 525 en la zona de desvío 500 detiene el flujo lateral 43 sobre la tira reactiva. Cuando se añade el compresor de muestras 30, este ejerce una presión 51 sobre el colector de muestras 535, y crea un puente por encima de la separación 525. El fluido se desvía 520 hacia el compresor de muestras 30 en un plano separado. Cuando el medio de elución, la muestra o el tampón fluye a través del compresor de muestras 30, este recoge el primer socio de unión de analito 37 del conjugado 36 y el socio de unión de zona de control 61. El flujo se desplaza a través de la porción de recogida 560 del colector de muestras 535 a medida que este vuelve a la tira reactiva después del extremo de la separación 525, en donde los componentes que se desplazan en el flujo interactúan con la muestra de interés. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, el analito 40 se une al primer socio de unión de analito 36 y el segundo socio de unión 38, creando un sándwich "vertical" con el conjugado 36 como la pieza de arriba y el segundo socio de unión 38 como la pieza de debajo, con el analito 40 entremedias de los mismos (véase la figura 4B). Si hay también un socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, también se transfiere el socio de unión de zona de control 61. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une entonces a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. La realización apropiada de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión de zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

45 Obsérvese que, mientras que las figuras 25A y 25B muestran los reactivos en una configuración determinada (similar a la de las figuras 5A a 5B), los reactivos se pueden colocar en unas configuraciones alternativas, por ejemplo las configuraciones que se muestran en las figuras 1, 3, 4, 6, 8 y 9 con la adición de la separación que se muestra en la figura 25. Además, la realización que se muestra en la figura 25 se podría usar en combinación con cualquiera de los elementos de intensificación o las realizaciones de encapsulación que se divulgan en el presente documento.

50 A pesar de que la separación 525 se muestra en las figuras 25A y 25B como extendiéndose hacia abajo hasta el sustrato de soporte, solo es necesario que la separación 525 sea de suficiente profundidad para detener el flujo. En otras realizaciones, la separación 525 se llena o se llena parcialmente con un material de barrera, que puede ser impermeable o permeable.

55 En otras realizaciones preferidas, más de una barrera, más de una separación, o una combinación de al menos una barrera y al menos una separación pueden constituir la zona de desvío.

60 Las figuras 26A y 26B muestran un dispositivo de flujo lateral con una bisagra 800, una zona de desvío 500, y un compresor de muestras 30 en otra realización de la presente invención. La bisagra 800 facilita la compresión, pero por lo demás la presente realización funciona de forma similar a las realizaciones de zona de desvío que se describen en las figuras 24 y 25. La bisagra 800 y la almohadilla de compresor de muestras 33 en la presente realización se podría usar con cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento. Como alternativa, la configuración de bisagra en la figura 8B se podría usar con una zona de desvío 500 en otras realizaciones de la invención. Obsérvese que, a pesar de que el colector de muestras 535 se muestra en estas figuras, se podría usar, como alternativa, el colector de muestras 35.

65

Las figuras 27A - 27C muestran un dispositivo de flujo lateral con una zona de desvío, un compresor de muestras y una tira reactiva cromatográfica que incluye un papel de separación en una realización de la presente invención. En la presente realización, al menos un papel de separación 760 es parte de la tira reactiva cromatográfica. El dispositivo que se muestra en las figuras 27A - 27C incluye al menos un papel de separación 760 que está ubicado adyacente a una zona de aplicación de muestra 44 sobre la tira reactiva cromatográfica. Para facilitar la aplicación de una muestra al papel de separación 760, el papel de separación está ubicado preferiblemente adyacente a la trayectoria del flujo lateral (en el mismo plano). La figura 27A muestra una vista lateral del dispositivo, por lo tanto solo es visible el papel de separación 760. La figura 27B muestra una vista desde arriba de la zona de aplicación de muestra 44 y el papel de separación adyacente 760. Una muestra se añade al papel de separación 760, por ejemplo una muestra de líquido se añade con una pipeta u otro dispositivo de adición de muestras, antes de la realización del ensayo. Antes de la compresión con el compresor de muestras 30, se da la vuelta al papel de separación 760 sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la trayectoria de flujo lateral, tal como se muestra en la figura 27C. A pesar de que el papel de separación 760 se muestra aguas abajo de la barrera 510 en la figura 25, el papel de separación 760 y la zona de aplicación de muestra 44 de forma opcional se puede encontrar aguas arriba de la barrera 510, o incluso sobre o solapándose con la barrera 510 en algunas realizaciones alternativas. Si hay múltiples papeles separadores 760, estos pueden estar ubicados en diferentes lugares sobre el dispositivo. La función y la estructura del dispositivo es por lo demás similar a la del dispositivo que se muestra y se describe en las figuras 25A y 25B.

Mientras que las figuras 1 - 18 y 24 - 25 muestran un elemento de hisopo 35, 535 con una porción de recogida de muestras 60, 560, en otras realizaciones, el dispositivo de recogida de muestras es al menos un papel de separación 660 que se coloca en la misma ubicación en la pila vertical que la porción de recogida de muestras 60, 560 del elemento de hisopo 35, 535 que se muestran en las figuras. Como un ejemplo, el dispositivo que se muestra en la figura 28 sustituye al elemento de hisopo 35, 535, con un papel de separación 660. A pesar de que el papel de separación 660 y la zona de aplicación de muestra 44 se muestran aguas abajo de la barrera 510 en la figura 28, el papel de separación 660 se puede aplicar de forma opcional aguas arriba de la barrera 510, o incluso sobre o solapándose con la barrera 510 en algunas realizaciones alternativas. En otras realizaciones, múltiples papeles separadores se pueden usar y ubicar en diferentes ubicaciones sobre el dispositivo. Este dispositivo en esta figura por lo demás opera de forma similar al dispositivo que se describe y se muestra en las figuras 24A y 24B.

Uno o más papeles separadores 660 o 760 se pueden usar como el colector de muestras en cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento.

Las figuras 29A y 29B muestran otra realización con una zona de desvío 500 que incluye una barrera 510. El sistema incluye un compresor de muestras 30 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). En la presente realización, la muestra preferiblemente se añade directamente al compresor de muestras 30. Un analito 40 se muestra sobre el compresor de muestras 30 para mostrar que la muestra se ha añadido al compresor de muestras 30. La tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de desvío 500, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. A pesar de que la zona de aplicación de muestra 44 en la presente realización es la ubicación en la que la muestra encuentra en primer lugar la tira reactiva, la muestra en la presente realización se añade al compresor de muestras 30 y se desplaza en el tampón de migración hasta la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva.

La tira reactiva preferiblemente también incluye un sustrato de soporte 48. La zona de desvío 500 incluye una barrera 510. La barrera 510 es preferiblemente una membrana impermeable (o una membrana sustancialmente impermeable) que se puede fabricar de cualquier material que evite que el flujo de líquido continúe fluyendo en el mismo plano. Algunos materiales para la barrera incluyen, pero sin limitarse a, plásticos, hidrocarburos o metal.

En la presente realización, $\frac{1}{2}$ del sándwich (el primer socio de unión 37 - analito 40) comienza a formarse sobre el compresor de muestras 30, y la totalidad del sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) se forma antes de que la muestra alcance la zona de prueba 45. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en la presente realización se puede encontrar en cualquier parte sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, y entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección.

En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión de zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión de zona de control 61 se compleja con su socio de unión 110 en la zona de control 46 cuando la prueba se ha realizado correctamente.

La zona de desvío 500 detiene por completo el flujo hasta que el compresor de muestras 30 se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido, tal como se muestra por medio

de la línea de puntos 520 en la figura 29B. El compresor de muestras 30 actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras 30. Esto aumenta la recogida del primer socio de unión 37, la muestra y el socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30. El fluido cambia de vuelta al plano lateral original en el extremo de la zona de desvío 500.

En otras realizaciones, el socio de unión de zona de control 61 podría estar ubicado sobre la tira reactiva, por ejemplo aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, sobre la zona de aplicación de muestra, o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra. En cualquiera de las realizaciones con un socio de unión de zona de control 61, el socio de unión de zona de control 61 no alcanzará la zona de control 46 a menos que el compresor de muestras 30 haya formado eficazmente el puente, permitiendo que el flujo continúe más allá de la barrera 510 (a medida que este se desplaza a través del compresor de muestras 30 en un plano alternativo) y entonces de vuelta sobre la tira reactiva.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión de zona de control 61 es también preferiblemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos frente al analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo que se muestra en la figura 29 se puede usar para cualquier ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión de ligando - receptor y ensayos de unión de enzima - sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferiblemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

Durante el funcionamiento, la muestra se coloca sobre el compresor de muestras 30. La barrera 510 en la zona de desvío 500 detiene el flujo lateral 43 sobre la tira reactiva. Cuando se añade el compresor de muestras 30, este crea un puente por encima de la barrera 510. El fluido se desvía 520 hacia el compresor de muestras 30 en un plano separado. Cuando el medio de elución, la muestra o el tampón fluye a través del compresor de muestras 30, este recoge la muestra, el primer socio de unión de analito 37 del conjugado 36 y el socio de unión de zona de control 61. El flujo vuelve a la tira reactiva después del extremo de la barrera 510. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, el analito 40 se une al primer socio de unión de analito 36 y el segundo socio de unión 38, creando un sándwich "vertical" con el conjugado 36 como la pieza de arriba y el segundo socio de unión 38 como la pieza de debajo, con el analito 40 entremedias de los mismos. Si hay también un socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, también se transfiere el socio de unión de zona de control 61. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une entonces a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. La realización apropiada de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión de zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

A pesar de que la barrera se muestra como una longitud específica en relación con el resto de la tira reactiva en las figuras 29A y 29B, las figuras son esquemáticas. La barrera 510 puede ser de cualquier longitud sobre la tira reactiva suficiente para detener el flujo y requerir que el compresor de muestras 30 vuelva a comenzar el flujo. La barrera 510 está diseñada para no ser tan larga como para obstruir el flujo de vuelta al interior del plano lateral en el extremo de aguas abajo del compresor de muestras 30.

En una realización preferida, la barrera 510 incluye componentes encapsulados. La barrera 510 en las presentes realizaciones se fabrica de un material que se disuelve con el tiempo (tal como se analiza en el presente documento), liberando los componentes encapsulados. La barrera 510 puede incluir cualquiera o la totalidad de los mismos reactivos que se han analizado en el presente documento como que se pueden encapsular. Una barrera que se está disolviendo 510 realiza unas funciones duales. De forma similar a las otras barreras 510, esta actúa como una pared para forzar el flujo al interior del compresor de muestras. Además, la misma retarda en el tiempo determinados componentes mediante la encapsulación de los mismos. El tampón o el medio de elución disuelve lentamente la barrera 510, y estos componentes retardados en el tiempo incidirán sobre el complejo de línea de prueba después de que los otros componentes del ensayo hayan alcanzado la línea de prueba.

Las figuras 30A y 30B muestran una zona de desvío 500 con una separación o surco 525. El sistema incluye un compresor de muestras 30 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). En la presente

realización, la muestra preferiblemente se añade directamente al compresor de muestras 30. Un analito 40 se muestra sobre el compresor de muestras 30 para mostrar que la muestra se ha añadido al compresor de muestras 30. La tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de desvío 500, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. A pesar de que la zona de aplicación de muestra 44 en la presente realización es la ubicación en la que la muestra encuentra en primer lugar la tira reactiva, la muestra en la presente realización se añade al compresor de muestras 30 y se desplaza en el tampón de migración hasta la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva.

La tira reactiva preferiblemente también incluye un sustrato de soporte 48. La zona de desvío 500 incluye una separación 525. La separación 525 interrumpe el flujo al eliminar las membranas que permiten el flujo a lo largo de la tira reactiva.

En la presente realización, $\frac{1}{2}$ del sándwich (el primer socio de unión 37 - analito 40) comienza a formarse sobre el compresor de muestras 30, y la totalidad del sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) se forma antes de que la muestra alcance la zona de prueba 45. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en la presente realización se puede encontrar en cualquier parte sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, y entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección.

En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión de zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión de zona de control 61 se compleja con su socio de unión 110 en la zona de control 46 cuando la prueba se ha realizado correctamente.

La zona de desvío 500 detiene por completo el flujo hasta que el compresor de muestras 30 se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido, tal como se muestra por medio de la línea de puntos 520 en la figura 30B. El compresor de muestras 30 actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras 30. Esto aumenta la recogida de la muestra, el primer socio de unión 37 y el socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30. El fluido cambia de vuelta al plano lateral original en el extremo de la zona de desvío 500.

En otras realizaciones, el socio de unión de zona de control 61 podría estar ubicado sobre la tira reactiva, por ejemplo aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44, sobre la zona de aplicación de muestra 44, o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. En cualquiera de las realizaciones con un socio de unión de zona de control 61, el socio de unión de zona de control 61 no alcanzará la zona de control 46 a menos que el compresor de muestras 30 haya formado eficazmente el puente, permitiendo que el flujo continúe más allá de la separación (a medida que este se desplaza a través del compresor de muestras 30 en un plano alternativo) y entonces de vuelta sobre la tira reactiva.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión de zona de control 61 es también preferiblemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos frente al analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo que se muestra en la figura 30 se puede usar para cualquier ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión de ligando - receptor y ensayos de unión de enzima - sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferiblemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

Durante el funcionamiento, la separación 525 en la zona de desvío 500 detiene el flujo lateral 43 sobre la tira reactiva. Cuando se añade el compresor de muestras 30, este crea un puente por encima de la separación 525. El

fluido se desvía 520 hacia el compresor de muestras 30 en un plano separado. Cuando el medio de elución, la muestra o el tampón fluye a través del compresor de muestras 30, este recoge la muestra, el primer socio de unión de analito 37 del conjugado 36 y el socio de unión de zona de control 61. El flujo vuelve a la tira reactiva después del extremo de la separación 525. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, el analito 40 se une al primer socio de unión de analito 36 y el segundo socio de unión 38, creando un sándwich "vertical" con el conjugado 36 como la pieza de arriba y el segundo socio de unión 38 como la pieza de debajo, con el analito 40 entremedias de los mismos. Si hay también un socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, también se transfiere el socio de unión de zona de control 61. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une entonces a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. La realización apropiada de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión de zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

A pesar de que la separación 525 se muestra en las figuras 30A y 30B como extendiéndose hacia abajo hasta el sustrato de soporte, solo es necesario que la separación 525 sea de suficiente profundidad para detener el flujo. En otras realizaciones, la separación 525 se llena o se llena parcialmente con un material de barrera, que puede ser impermeable o permeable.

En otras realizaciones preferidas, más de una barrera, más de una separación, o una combinación de al menos una barrera y al menos una separación pueden constituir la zona de desvío.

Las figuras 31A y 31B muestran otra realización con una zona de desvío 500 que incluye una barrera 510. El sistema incluye un compresor de muestras 30 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). La tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de desvío 500, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva preferiblemente también incluye un sustrato de soporte 48.

La zona de desvío 500 incluye una barrera 510. La barrera 510 es preferiblemente una membrana impermeable (o una membrana sustancialmente impermeable) que se puede fabricar de cualquier material que evite que el flujo de líquido continúe fluyendo en el mismo plano. Algunos materiales para la barrera incluyen, pero sin limitarse a, plásticos, hidrocarburos o metal.

En la presente realización, la muestra preferiblemente se añade directamente a la zona de aplicación de muestra 44. Un analito 40 se muestra en la zona de aplicación de muestra 44 para mostrar que la muestra se ha añadido a la zona de aplicación de muestra 44. La totalidad del sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) se forma en la zona de aplicación de muestra 44. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en la presente realización se puede encontrar en cualquier parte sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, y entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección. De forma similar, la zona de aplicación de muestra 44 se puede encontrar aguas arriba de la zona de desvío 500, aguas abajo de la zona de desvío 500, o solapándose con o encima de la zona de desvío 500.

En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión de zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión de zona de control 61 se compleja con su socio de unión 110 en la zona de control 46 cuando la prueba se ha realizado correctamente.

La zona de desvío 500 detiene por completo el flujo hasta que el compresor de muestras 30 se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido, tal como se muestra por medio de la línea de puntos 520 en la figura 31B. El compresor de muestras 30 actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras 30. Esto aumenta la recogida del primer socio de unión 37 y el socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30. El fluido cambia de vuelta al plano lateral original en el extremo de la zona de desvío 500.

En otras realizaciones, el socio de unión de zona de control 61 podría estar ubicado sobre la tira reactiva, por ejemplo aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, sobre la zona de aplicación de muestra, o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra. En cualquiera de las realizaciones con un socio de unión de zona de control 61, el socio de unión de zona de control 61 no alcanzará la zona de control 46 a menos que el compresor de muestras 30 haya formado eficazmente el puente, permitiendo que el flujo continúe más allá de la barrera 510 (a medida que este se desplaza a través del compresor de muestras 30 en un plano alternativo) y entonces de vuelta sobre la tira reactiva.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión de zona de control 61 es también preferiblemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos frente al analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo que se muestra en la figura 31 se puede usar para cualquier ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión de ligando - receptor y ensayos de unión de enzima - sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferiblemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.

Durante el funcionamiento, la muestra se coloca sobre la zona de aplicación de muestra 44. La barrera 510 en la zona de desvío 500 detiene el flujo lateral 43 sobre la tira reactiva. Cuando se añade el compresor de muestras 30, este ejerce una presión 51 sobre la tira reactiva, y crea un puente por encima de la barrera 510. El fluido se desvía 520 hacia el compresor de muestras 30 en un plano separado. Cuando el medio de elución, la muestra o el tampón fluye a través del compresor de muestras 30, este recoge el primer socio de unión de analito 37 del conjugado 36 y el socio de unión de zona de control 61. El flujo vuelve a la tira reactiva después del extremo de la barrera 510, en donde los componentes que se desplazan en el flujo interactúan con la muestra de interés. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, el analito 40 se une al primer socio de unión de analito 36 y el segundo socio de unión 38, creando un sándwich "vertical" con el conjugado 36 como la pieza de arriba y el segundo socio de unión 38 como la pieza de abajo, con el analito 40 entremedias de los mismos. Si hay también un socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, también se transfiere el socio de unión de zona de control 61. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une entonces a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. La realización apropiada de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión de zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

A pesar de que la barrera se muestra como una longitud específica en relación con el resto de la tira reactiva en las figuras 31A y 31B, las figuras son esquemáticas. La barrera 510 puede ser de cualquier longitud sobre la tira reactiva suficiente para detener el flujo y requerir que el compresor de muestras 30 vuelva a comenzar el flujo. La barrera 510 está diseñada para no ser tan larga como para obstruir el flujo de vuelta al interior del plano lateral en el extremo de aguas abajo del compresor de muestras 30.

En una realización preferida, la barrera 510 incluye componentes encapsulados. La barrera 510 en las presentes realizaciones se fabrica de un material que se disuelve con el tiempo (tal como se analiza en el presente documento), liberando los componentes encapsulados. La barrera 510 puede incluir cualquiera o la totalidad de los mismos reactivos que se han analizado en el presente documento como que se pueden encapsular. Una barrera que se está disolviendo 510 realiza unas funciones duales. De forma similar a las otras barreras 510, esta actúa como una pared para forzar el flujo al interior del compresor de muestras. Además, la misma retarda en el tiempo determinados componentes mediante la encapsulación de los mismos. El tampón o el medio de elución disuelve lentamente la barrera 510, y estos componentes retardados en el tiempo incidirán sobre el complejo de línea de prueba después de que los otros componentes del ensayo hayan alcanzado la línea de prueba.

Las figuras 32A y 32B muestran una zona de desvío 500 con una separación o surco 525. El sistema incluye un compresor de muestras 30 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). La tira reactiva preferiblemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de desvío 500, una zona de aplicación de muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva preferiblemente también incluye un sustrato de soporte 48. La zona de desvío 500 incluye una separación 525. La separación 525 interrumpe el flujo al eliminar las membranas que permiten el flujo a lo largo de la tira reactiva.

En la presente realización, la muestra preferiblemente se añade directamente a la zona de aplicación de muestra 44. Un analito 40 se muestra en la zona de aplicación de muestra 44 para mostrar que la muestra se ha añadido a la zona de aplicación de muestra 44. La totalidad del sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) se forma en la zona de aplicación de muestra 44. La zona de prueba 45 en la presente realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En la presente realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para

- 5 formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en la presente realización preferiblemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en la presente realización se puede encontrar en cualquier parte sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, pero sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, y entre la zona de aplicación de muestra y la zona de detección. De forma similar, la zona de aplicación de muestra 44 se puede encontrar aguas arriba de la zona de desvío 500, aguas abajo de la zona de desvío 500, o solapándose con o encima de la zona de desvío 500.
- 10 En algunas realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión de zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión de zona de control 61 se compleja con su socio de unión 110 en la zona de control 46 cuando la prueba se ha realizado correctamente.
- 15 La zona de desvío 500 detiene por completo el flujo hasta que el compresor de muestras 30 se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido, tal como se muestra por medio de la línea de puntos 520 en la figura 32B. El compresor de muestras 30 actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras 30. Esto aumenta la recogida del primer socio de unión 37 y el socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30. El fluido cambia de vuelta al plano lateral original en el extremo de la zona de desvío 500.
- 20 En otras realizaciones, el socio de unión de zona de control 61 podría estar ubicado sobre la tira reactiva, por ejemplo aguas arriba de la zona de aplicación de muestra 44, sobre la zona de aplicación de muestra 44, o aguas abajo de la zona de aplicación de muestra 44. En cualquiera de las realizaciones con un socio de unión de zona de control 61, el socio de unión de zona de control 61 no alcanzará la zona de control 46 a menos que el compresor de muestras 30 haya formado eficazmente el puente, permitiendo que el flujo continúe más allá de la separación (a medida que este se desplaza a través del compresor de muestras 30 en un plano alternativo) y entonces de vuelta sobre la tira reactiva.
- 25 En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión de zona de control 61 es también preferiblemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos frente al analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo que se muestra en la figura 32 se puede usar para cualquier ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo / antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión de ligando - receptor y ensayos de unión de enzima - sustrato.
- 30 En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En algunas realizaciones en las que la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferiblemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En las presentes realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferiblemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glicosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glicosilo es una unidad glicosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada se pueden invertir dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glicosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, se pueden usar otros receptores y ligandos para las marcas.
- 35 Durante el funcionamiento, la separación 525 en la zona de desvío 500 detiene el flujo lateral 43 sobre la tira reactiva. Cuando se añade el compresor de muestras 30, este crea un puente por encima de la separación 525. El fluido se desvía 520 hacia el compresor de muestras 30 en un plano separado. Cuando el medio de elución o el tampón fluye a través del compresor de muestras 30, este recoge el primer socio de unión de analito 37 del conjugado 36 y el socio de unión de zona de control 61. El flujo vuelve a la tira reactiva después del extremo de la separación 525, en donde los componentes que se desplazan en el flujo interactúan con la muestra de interés. Si el analito 40 se encuentra presente en la muestra, el analito 40 se une al primer socio de unión de analito 36 y el segundo socio de unión 38, creando un sándwich "vertical" con el conjugado 36 como la pieza de arriba y el segundo socio de unión 38 como la pieza de debajo, con el analito 40 entre medias de los mismos (véase la figura 4B). Si hay también un socio de unión de zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, también se transfiere el socio de unión de zona de control 61. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une entonces a la marca 39. Debido a que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. La realización apropiada de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión de zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65 A pesar de que la separación 525 se muestra en las figuras 32A y 32B como extendiéndose hacia abajo hasta el sustrato de soporte, solo es necesario que la separación 525 sea de suficiente profundidad para detener el flujo. En

otras realizaciones, la separación 525 se llena o se llena parcialmente con un material de barrera, que puede ser impermeable o permeable.

5 En otras realizaciones preferidas, más de una barrera, más de una separación, o una combinación de al menos una barrera y al menos una separación pueden constituir la zona de desvío.

10 Las figuras 33A y 33B muestran un dispositivo de flujo lateral con una bisagra 800, una zona de desvío 500, y un compresor de muestras 30 en otra realización de la presente invención. La bisagra 800 facilita la compresión, pero por lo demás la presente realización funciona de forma similar a las realizaciones de zona de desvío que se describen en las figuras 29 y 30. La bisagra 800 y la almohadilla de compresor de muestras 33 en la presente realización se podrían usar con cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento. Como alternativa, la configuración de bisagra en la figura 8B se podría usar con una zona de desvío 500 en otras realizaciones de la invención.

15 Las figuras 34A y 34B muestran un dispositivo de flujo lateral con una bisagra 800, una zona de desvío 500, y un compresor de muestras 30 en otra realización de la presente invención. La bisagra 800 facilita la compresión, pero por lo demás la presente realización funciona de forma similar a las realizaciones de zona de desvío que se describen en las figuras 31 y 32. La bisagra 800 y la almohadilla de compresor de muestras 33 en la presente realización se podrían usar con cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento. Como alternativa, la configuración de bisagra en la figura 8B se podría usar con una zona de desvío 500 en otras realizaciones de la invención.

20 A pesar de que las figuras 24 - 34 se describen usando socios de unión para el analito aguas arriba de la zona de prueba, con unas marcas 50 inmovilizadas en la zona de prueba, en otras realizaciones alternativas, el segundo socio de unión 38 para el analito se podría inmovilizar en la zona de prueba en la totalidad de las configuraciones de tira reactiva que se describen en las figuras 24 - 34. En las presentes realizaciones, solo $\frac{1}{2}$ del sándwich (primer socio de unión 37 - analito 40) se forma antes de que la muestra alcance la zona de prueba.

25 Algunas realizaciones con el segundo socio de unión 38 en la zona de prueba 45 se muestran en las figuras 35A y 35B, la figura 36A y 36B, la figura 37A y 37B, la figura 38, la figura 39, las figuras 40A y 40B, las figuras 41A y 41B, las figuras 42A y 42B, las figuras 43A y 43B, las figuras 44A y 44B, y las figuras 45A y 45B. Las presentes realizaciones son similares a las realizaciones que se muestran en las figuras 24A y 24B, las figuras 25A y 25B, las figuras 26A y 26B, las figuras 27A a 27C, la figura 28, la figura 29, las figuras 30A y 30B, las figuras 31A y 31B, las figuras 32A y 32B, las figuras 33A y 33B, y las figuras 34A y 34B, respectivamente, excepto que por no hay marca 39 o marca inmovilizada 50 alguna y el segundo socio de unión 38 está inmovilizado en la zona de prueba 45. En consecuencia, el sándwich completo (primer socio de unión 37 - analito 40 - segundo socio de unión 38) no se forma hasta que la muestra alcanza la zona de prueba 45.

30 En otras realizaciones con un compresor de muestras 30, el compresor de muestras no incluye reactivo alguno para la prueba, y se usa solo para proporcionar una presión o para formar un puente sobre una zona de desvío sobre la tira reactiva.

Tiras reactivas bimodales que usan una zona de desvío

35 De forma aislada, ni MxA ni CRP es por sí solo sensible o específico en la identificación de infecciones tanto bacterianas como víricas. Los valores de corte bajos de CRP muestran una alta sensibilidad y una baja especificidad para detectar infecciones bacterianas. Los valores de corte altos de CRP muestran una baja sensibilidad y una alta especificidad para detectar infecciones bacterianas. MxA es específico para identificar una infección vírica, pero el mismo no es sensible para infecciones bacterianas. Un patrón multiplexado de resultados que incluyen puntos de decisión médica que reflejan valores de corte de CRP bajo, CRP alto y MxA proporciona de forma conjunta una forma sensible y específica para identificar una respuesta inmune a una infección vírica y/o bacteriana.

40 En una realización preferida de un inmunoensayo de flujo lateral multiplexado, el patrón de sangre extraída de la yema del dedo de resultados de prueba muestra un resultado positivo con una equivalencia de suero con un corte de nivel de CRP bajo de aproximadamente 10 mg/l, una equivalencia de suero con un corte de nivel de CRP alto de aproximadamente 80 mg/l y un corte de MxA de aproximadamente 40 ng/ml.

45 Las tiras reactivas duales bimodales se pueden usar para diferenciar infecciones bacterianas y víricas en seres humanos, pero también se pueden usar en aplicaciones veterinarias para animales. Debido a que el CRP difiere dependiendo de la especie, no hay anticuerpos comunes para CRP entre especies. Por lo tanto, es necesario que las pruebas veterinarias incluyan CRP específico de la especie particular que se esté sometiendo a prueba. El MxA se conserva bien entre especies, por lo tanto es posible usar MxA humano en pruebas veterinarias. No obstante, el MxA para una especie particular se podría usar como alternativa para intentar aumentar adicionalmente la especificidad. Se pueden desarrollar pruebas veterinarias que usan las tiras reactivas duales bimodales que se describen en el presente documento para una especie específica, incluyendo, pero sin limitarse a, gatos, perros, conejos, cerdos, ovejas, caballos, vacas, monos, chimpancés, babuinos u orangutanes.

Una configuración preferida para un dispositivo de análisis de muestra de tira reactiva dual bimodal con una zona de desvío sobre ambas tiras reactivas se muestra en las figuras 46A a 46C. El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta reactiva 899 incluye una carcasa cerrable 835 con dos lados 836, 837 y una espina o porción articulada 831. En una realización preferida, la tarjeta reactiva 899 es de aproximadamente 11,5 cm de longitud (L) x 7 cm de anchura (W) cuando los dos lados 836, 837 están cerrados. No obstante, se puede usar una tarjeta reactiva de cualquier tamaño 899 que dé cabida a la totalidad de los componentes. Dentro del primer lado 836 de la carcasa 835, hay dos tiras reactivas 815, 825, incluyendo cada una una almohadilla de recepción 845, una zona de desvío 850, una almohadilla de transferencia 855 y una zona de detección 805. El primer lado 836 también incluye una almohadilla absorbente 840 y preferiblemente una almohadilla de desechos 860. La primera tira reactiva 815 preferiblemente incluye una zona de detección 805 con una línea de prueba de MxA 802, una línea de prueba de CRP bajo 803 y una línea de control 804. La segunda tira reactiva 825 preferiblemente incluye una zona de detección 805 con una línea de prueba de CRP alto 823 y una línea de control 804. La totalidad de las líneas de prueba son visibles a través de las ventanas 865 sobre el segundo lado 837 de la carcasa 835 cuando la carcasa 835 está cerrada. La almohadilla absorbente 840 es preferiblemente una almohadilla individual a la que se añade el tampón de migración para iniciar el flujo lateral. De forma similar, la almohadilla de desechos 860 es preferiblemente una almohadilla individual que recoge el tampón de migración en exceso al final de la prueba. No obstante, en otras realizaciones, cada tira podría tener una almohadilla absorbente separada 840 y/o una almohadilla de desechos 860.

El segundo lado 837 de la carcasa 835 incluye tres secciones separadas 838, 839 y 870. La porción intermedia, un compresor de muestras o solapa 870, preferiblemente incluye dos zonas de conjugado 872, 874, incluyendo cada una un socio de unión marcado para al menos un analito, y un control marcado. Una ventana 843 está ubicada en la porción inferior 838 del segundo lado 837 de la carcasa de tal modo que el tampón se puede añadir a la almohadilla absorbente 840 cuando la carcasa 835 está cerrada. Las ventanas de visualización 865 para las zonas de detección 805 se encuentran sobre la porción superior 839 del segundo lado 837 de la carcasa 835.

Asimismo, preferiblemente cada una de la porción superior 839 y la porción inferior 838 del segundo lado 837 de la carcasa 835 incluye al menos un botón, chaveta o saliente 875 que coincide con uno o más orificios 895 de tal modo que las porciones superior e inferior 838, 839 se puedan sujetar fácilmente sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En una realización preferida, hay dos chavetas 875 sobre la porción inferior 838 que coinciden con dos orificios 895 que flanquean la almohadilla absorbente 840 sobre el primer lado 836 de la carcasa 835 y dos chavetas 875 sobre la porción superior 839 que coinciden con dos orificios 895 que flanquean la almohadilla de desechos 860 sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En otras realizaciones, los orificios 895 se encuentran sobre el segundo lado 837 de la carcasa 835 y las chavetas 875 se encuentran sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En aún otras realizaciones, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversible para afianzar la porción superior 838 y/o la porción inferior 839 del segundo lado 837 de la carcasa 835 al primer lado 836 de la carcasa 835. En otras realizaciones, las secciones superior e inferior 838, 839 se cierran de forma permanente, por ejemplo usando un adhesivo, antes del uso.

La solapa 870, que también se conoce como un compresor de muestras, sobre el segundo lado 837 de la carcasa incluye dos zonas de conjugado 872, 874 y dos zonas de aplicación de muestra 873, 876, y se puede abrir y cerrar con facilidad. La solapa 870 preferiblemente también incluye al menos un botón, chaveta o saliente 875 que coincide con uno o más orificios 895 de tal modo que la solapa 870 se cierra correctamente con facilidad sobre el primer lado 836 de la carcasa 835 después de que se haya añadido una muestra a las zonas de aplicación de muestra 873, 876. En otras realizaciones, los orificios 895 se encuentran sobre el segundo lado 837 de la carcasa 835 y las chavetas 875 se encuentran sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En aún otras realizaciones, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversible para afianzar la solapa 870 al primer lado 836 de la carcasa 835.

Las zonas de conjugado 872, 874 y las zonas de aplicación de muestra 873, 876 preferiblemente se solapan. En algunas realizaciones preferidas, las zonas de conjugado 872, 874 se colorean debido a los colorantes en los conjugados de muestra y los conjugados de control, y la muestra se coloca directamente sobre la porción coloreada de la solapa 870. En una realización preferida, la zona de conjugado 872 que se usa para la primera tira reactiva 815 contiene un socio de unión de MxA que está marcado con un colorante de color rojo, un socio de unión de CRP bajo que está marcado con un colorante de color negro, y un socio de unión de control que está marcado con un colorante de color azul. En la presente realización, la zona de conjugado 872 aparece de color púrpuro. La otra zona de conjugado 874 contiene un socio de unión de CRP alto que está marcado con un colorante de color negro y un socio de unión de control que está marcado con un colorante de color azul. En la presente realización, la zona de conjugado 874 aparece de color azulado.

La zona de desvío 850 preferiblemente incluye una separación o barrera que interrumpe el flujo lateral, desviando el tampón de migración hacia arriba hacia la solapa 870 que incluye las zonas de conjugado 872, 874 y las zonas de aplicación de muestra 873, 876.

Durante el funcionamiento, las porciones superior e inferior 838, 839 del segundo lado 837 de la carcasa 835 preferiblemente se cierran a presión antes del uso al afianzar las chavetas 875 a los orificios 895. El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta reactiva 899 preferiblemente se coloca sobre una superficie plana. Si la solapa 870 está ya abierta, el usuario la abre para acceder a las zonas de aplicación de muestra 873, 876. Se toma del paciente

una muestra de sangre que se va a someter a prueba. La muestra se puede recoger por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización preferida, una muestra de 5 µl de sangre se añade a cada una de las zonas de aplicación de muestra 873, 876 y entonces se cierra la solapa 870. Cada una de las muestras de 5 µl se recoge preferiblemente con independencia de la otra. Las muestras de sangre preferiblemente se añaden directamente al dispositivo 899, sin pretratamiento alguno.

Para asegurar que el compresor de muestras o solapa 870 se ha cerrado correctamente, se aplica preferiblemente una presión a la carcasa 835 por encima de las chavetas 875 para cerrar a presión las chavetas 875. Es necesario que la parte de arriba de la solapa 870 se encuentre a nivel con la parte de arriba del resto del segundo lado 837 de la carcasa 835 para que la prueba se realice de forma apropiada. Se añade tampón de migración a la almohadilla absorbente 840, lo que inicia el flujo lateral 885. En algunas realizaciones preferidas, el tampón de migración incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer el MxA intracelular en la muestra. Cuando el tampón de migración alcanza la zona de desvío 850, este se desvía hacia arriba hacia la solapa 870. Este se desplaza a través de las zonas de conjugado 872, 874, recogiendo cualquier complejo que se haya formado entre el socio de unión de MxA y MxA en la muestra, el socio de unión de CRP bajo y niveles bajos de CRP en la muestra, el socio de unión de CRP alto y niveles altos de CRP en la muestra, así como el conjugado de control.

Debido a que las zonas de conjugado 872, 874 forman un puente sobre la zona de desvío 850 sobre las tiras reactivas de flujo lateral 815, 825, el tampón de migración, que ahora contiene muestra, conjugado y los complejos que se han descrito en lo que antecede, se desplaza entonces a la almohadilla de transferencia 855, y a las zonas de detección 805 sobre cada una de las tiras reactivas 815, 825. Si MxA se encuentra presente en la muestra, la línea de prueba de MxA 802 sobre la primera tira reactiva 815 será de color rojo. Si un nivel bajo umbral de CRP se encuentra presente en la muestra, la línea de prueba de CRP bajo 803 sobre la primera tira reactiva 815 será de color negro. Si un nivel alto umbral de CRP se encuentra presente en la muestra, la línea de prueba de CRP alto 823 sobre la segunda tira reactiva 825 será de color negro. Si la prueba se realiza correctamente, las líneas de control 804 tanto sobre la primera tira 815 como sobre la segunda tira reactiva 825 serán de color azul. En algunas realizaciones preferidas, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para CRP bajo sobre la primera tira reactiva 815 y 80 mg/l para CRP alto sobre la segunda tira reactiva 825. Los resultados de la prueba deberían ser visibles después de aproximadamente 5 - 20 minutos, preferiblemente en un plazo de aproximadamente 10 minutos.

Debido a que el socio de unión de control se encuentra sobre el compresor de muestras o solapa 870 y no sobre ninguna de las tiras reactivas 815, 825, hay un auténtico control procedimental en esta configuración. Si la solapa 870 no se ha cerrado de forma apropiada, nada aparecerá en la zona de detección 805, lo que indica que la prueba se realizó de forma no apropiada.

Las figuras 47A a 47F muestran resultados de prueba usando el dispositivo 899 que se muestra en las figuras 46A a 46C, con dos tiras reactivas 815, 825 una junto a otra, en las que una primera tira reactiva 815 realiza una prueba en busca de la presencia tanto de MxA como de niveles bajos de CRP y la segunda tira reactiva 825 realiza una prueba en busca de niveles altos de CRP.

La figura 47A muestra un resultado negativo en la línea de prueba de MxA 802 y un resultado negativo en la línea de prueba de CRP bajo 803 sobre la primera tira reactiva 815, así como un resultado negativo en la línea de prueba de CRP alto 823 sobre la segunda tira reactiva 825. Más en concreto, las únicas líneas visibles en la zona de detección 805 del ensayo de flujo lateral 899 son las dos líneas de control de color azul 804. Este resultado indica que la muestra es negativa para infecciones tanto bacterianas como víricas.

Las figuras 47B y 47C son positivos para una infección vírica. En la figura 47B, la presencia de dos líneas de control de color azul 804 y una línea de MxA de color rojo 802 indican una infección vírica. En la figura 47C, la presencia de dos líneas de control de color azul 804 y una línea de MxA de color rojo 802 indican una infección vírica. Debido a que hay también una línea de CRP bajo de color negro 803 en la figura 47C, hay una posibilidad de una infección conjunta bacteriana, a pesar de que existe la ausencia de una línea de CRP alto 823.

Las figuras 47D y 47E son positivos para una infección bacteriana. En la figura 47D, la presencia de dos líneas de control de color azul 804 y una línea de CRP bajo de color negro 803 indica una infección bacteriana. En la figura 47E, la presencia de dos líneas de control de color azul 804, una línea de CRP bajo de color negro 803, y una línea de CRP alto de color negro 823 también indica una infección bacteriana. La línea de MxA se encuentra ausente en ambas figuras 47D y 47E, indicando la ausencia de una infección vírica.

La figura 47F indica una infección conjunta (infecciones tanto bacterianas como víricas). La presencia de dos líneas de control de color azul 804, una línea de MxA de color rojo 802, una línea de CRP bajo de color negro 803, y una línea de CRP alto de color negro 823 indica la presencia de infecciones tanto bacterianas como víricas.

Otra configuración preferida para un dispositivo de análisis de muestra de tira reactiva dual bimodal 1000 se muestra en las figuras 48A a 48C. Esta configuración 1000 es similar a la configuración 899 que se muestra en las figuras

46A a 46C, pero las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076 están ubicadas sobre cada una de las tiras reactivas 1015, 1025, aguas abajo de la zona de desvío 850. El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta reactiva 1000 incluye una carcasa cerrable 835 con dos lados 836, 837 y una espina o porción articulada 831. En una realización preferida, la tarjeta reactiva 1000 es de aproximadamente 11,5 cm de longitud (L) x 7 cm de anchura (W) cuando los dos lados 836, 837 están cerrados. No obstante, se puede usar una tarjeta reactiva de cualquier tamaño 1000 que dé cabida a la totalidad de los componentes. Dentro del primer lado 836 de la carcasa 835, hay dos tiras reactivas 1015, 1025, incluyendo cada una una almohadilla de recepción 845, una zona de desvío 850, una almohadilla de transferencia 1055 y una zona de detección 805. El primer lado 836 también incluye una almohadilla absorbente 840 y preferiblemente una almohadilla de desechos 860. La primera tira reactiva 1015 preferiblemente incluye una zona de detección 805 con una línea de prueba de MxA 802, una línea de prueba de CRP bajo 803 y una línea de control 804. La segunda tira reactiva 1025 preferiblemente incluye una zona de detección 805 con una línea de prueba de CRP alto 823 y una línea de control 804. La totalidad de las líneas de prueba son visibles a través de las ventanas 865 sobre el segundo lado 837 de la carcasa 835 cuando la carcasa 835 está cerrada. La almohadilla absorbente 840 es preferiblemente una almohadilla individual a la que se añade el tampón de migración para iniciar el flujo lateral. De forma similar, la almohadilla de desechos 860 es preferiblemente una almohadilla individual que recoge el tampón de migración en exceso al final de la prueba. No obstante, en otras realizaciones, cada tira podría tener una almohadilla absorbente separada 840 y/o una almohadilla de desechos 860.

El segundo lado 837 de la carcasa 835 incluye tres secciones separadas 838, 839 y 1070. La porción intermedia, o solapa 1070, que también se conoce como un compresor de muestras, preferiblemente incluye dos zonas de conjugado 872, 874, incluyendo cada una un socio de unión marcado para al menos un analito, y un control marcado. Una ventana 843 está ubicada en la porción inferior 838 del segundo lado 837 de la carcasa de tal modo que el tampón se puede añadir cuando la carcasa 835 está cerrada. Las ventanas de visualización 865 para las zonas de detección 805 se encuentran sobre la porción superior 839 del segundo lado 837 de la carcasa 835.

Asimismo, preferiblemente cada una de la porción superior 839 y la porción inferior 838 del segundo lado 837 de la carcasa 835 incluye al menos un botón, chaveta o saliente 875 que coincide con uno o más orificios 895 de tal modo que las porciones superior e inferior 838, 839 se puedan sujetar fácilmente sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En una realización preferida, hay dos chavetas 875 sobre la porción inferior 838 que coinciden con dos orificios 895 que flanquean la almohadilla absorbente 840 sobre el primer lado 836 de la carcasa 835 y dos chavetas 875 sobre la porción superior 839 que coinciden con dos orificios 895 que flanquean la almohadilla de desechos 860 sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En otras realizaciones, los orificios 895 se encuentran sobre el segundo lado 837 de la carcasa 835 y las chavetas 875 se encuentran sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En aún otras realizaciones, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversible para afianzar la porción superior 838 y/o la porción inferior 839 del segundo lado 837 de la carcasa 835 al primer lado 836 de la carcasa 835. En otras realizaciones, las secciones superior e inferior 838, 839 se cierran de forma permanente, por ejemplo por medio de un adhesivo, antes del uso.

La solapa 1070 sobre el segundo lado 837 de la carcasa incluye dos zonas de conjugado 872, 874 y se puede abrir y cerrar con facilidad. La solapa 1070 preferiblemente también incluye al menos un botón, chaveta o saliente 875 que coincide con uno o más orificios 895 de tal modo que la solapa 1070 se cierra correctamente con facilidad sobre el primer lado 836 de la carcasa 835 después de que se haya añadido una muestra a las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076 sobre las tiras reactivas 1015, 1025. En otras realizaciones, los orificios 895 se encuentran sobre el segundo lado 837 de la carcasa 835 y las chavetas 875 se encuentran sobre el primer lado 836 de la carcasa 835. En aún otras realizaciones, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversible para afianzar la solapa 1070 al primer lado 836 de la carcasa 835.

En algunas realizaciones preferidas, las zonas de conjugado 872, 874 se colorean debido a los colorantes en los conjugados de muestra y los conjugados de control. En una realización preferida, la zona de conjugado 872 que se usa para la primera tira reactiva 1015 contiene un socio de unión de MxA que está marcado con un colorante de color rojo, un socio de unión de CRP bajo que está marcado con un colorante de color negro, y un socio de unión de control que está marcado con un colorante de color azul. En la presente realización, la zona de conjugado 872 aparece de color púrpuro. La otra zona de conjugado 874 contiene un socio de unión de CRP alto que está marcado con un colorante de color negro y un socio de unión de control que está marcado con un colorante de color azul. En la presente realización, la zona de conjugado 874 aparece de color azulado.

La zona de desvío 850, que preferiblemente incluye una separación o barrera, interrumpe el flujo lateral, desviando el tampón de migración hacia arriba hacia la solapa 1070 que incluye las zonas de conjugado 872, 874.

Durante el funcionamiento, las porciones superior e inferior 838, 839 del segundo lado 837 de la carcasa 835 preferiblemente se cierran a presión antes del uso al afianzar las chavetas 875 a los orificios 895. El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta reactiva 1000 preferiblemente se coloca sobre una superficie plana. Si la solapa 1070 no está ya abierta, el usuario la abre para acceder a las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076. Las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076 pueden estar ubicadas en cualquier porción de la almohadilla de transferencia 1055. Se toma del paciente una muestra de sangre que se va a someter a prueba. La muestra se puede recoger por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización preferida, una muestra de 5 µl de

5 sangre se añade a cada una de las zonas de las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076 y entonces se cierra la solapa 1070. Cada una de las muestras de 5 µl se recoge preferiblemente con independencia de la otra. La sangre preferiblemente se añade directamente al dispositivo 1000, sin pretratamiento alguno. En algunas realizaciones preferidas, una flecha 1002 u otra indicación (que se muestra en la figura 48A), por ejemplo las palabras "añadir muestra aquí" muestran al usuario en dónde colocar la muestra sobre las tiras reactivas 1015, 1025.

10 Para asegurar que la solapa 1070 se ha cerrado correctamente, se aplica preferiblemente una presión a la carcasa 835 por encima de las chavetas 875 para cerrar a presión las chavetas 875. Es necesario que la parte de arriba de la solapa 1070 se encuentre a nivel con la parte de arriba del resto del segundo lado 837 de la carcasa 835 para que la prueba se realice de forma apropiada. Se añade tampón de migración a la almohadilla absorbente 840, lo que inicia el flujo lateral 885. En algunas realizaciones preferidas, el tampón de migración incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer el MxA intracelular en la muestra. Cuando el tampón de migración alcanza la zona de desvío 850, este se desvía hacia arriba hacia la solapa 1070. Este se desplaza a través de las zonas de conjugado 872, 874, recogiendo los socios de unión de MxA, los socios de unión de CRP bajo, y los socios de unión de CRP alto, así como el conjugado de control.

20 Debido a que las zonas de conjugado 872, 874 forman un puente sobre la zona de desvío 850 sobre las tiras reactivas de flujo lateral 1015, 1025, el tampón de migración, que ahora contiene un conjugado, se desplaza entonces a la almohadilla de transferencia 1055, que incluye las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076, y a las zonas de detección 805 sobre cada una de las tiras reactivas 1015, 1025. Si MxA se encuentra presente en la muestra, la línea de prueba de MxA 802 sobre la primera tira reactiva 1015 será de color rojo. Si un nivel bajo umbral de CRP se encuentra presente en la muestra, la línea de prueba de CRP bajo (803) sobre la primera tira reactiva (1015) será de color negro. Si un nivel alto umbral de CRP se encuentra presente en la muestra, la línea de prueba de CRP alto 823 sobre la segunda tira reactiva 1025 será de color negro. En algunas realizaciones preferidas, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para CRP bajo sobre la primera tira reactiva 1015 y 80 mg/l para CRP alto sobre la segunda tira reactiva 1025. Los resultados de la prueba deberían ser visibles después de aproximadamente 5 - 20 minutos, preferiblemente en un plazo de aproximadamente 10 minutos. Si la prueba se realizó correctamente, las líneas de control 804 tanto sobre la primera tira 1015 como sobre la segunda tira reactiva 1025 serán de color azul.

30 Debido a que el socio de unión de control se encuentra sobre la solapa (1070) y no sobre ninguna de las tiras reactivas 1015, 1025, hay un auténtico control procedimental en esta configuración. Si la solapa 1070 no se ha cerrado de forma apropiada, nada aparecerá en la zona de detección 805, lo que indica que la prueba se realizó de forma no apropiada.

35 En una realización alternativa, las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076 están ubicadas sobre la almohadilla de recepción 845, antes de la zona de desvío 850. En la presente realización, el tampón de migración se desplaza a través de las zonas de aplicación de muestra 1073, 1076, y entonces se desvía hacia la solapa 1070.

40 En algunas realizaciones preferidas de las configuraciones que se muestran en las figuras 46A a 46C y 48A a 48C, más de aproximadamente 1,2 ml de tampón de migración se coloca sobre la almohadilla absorbente 840. Si se añade menos de 1,0 ml en algunas realizaciones en las que la zona de desvío (850) es una separación, el tampón queda atascado en la separación debido a que la separación contiene aproximadamente 1,0 ml.

45 Tal como se muestra en la figura 49, en una realización preferida, un kit 1100 incluye el dispositivo de análisis de muestras 800, 1000, una lanceta 1102, una o más pipetas 1101 y un tampón de migración 1103. La lanceta 1102 se usa para realizar una punción en la piel y una o más pipetas 1101 se usan para recoger la sangre del sitio de punción. En una realización preferida, 5 µl de sangre se transfieren a partir de una primera pipeta 1101 a la primera zona de conjugado 872 y otros 5 µl de sangre se transfieren a partir de una segunda pipeta 1101 y se añaden a la segunda zona de conjugado 874. Se cierra la solapa 870, y el tampón de migración 1103 se añade a la almohadilla absorbente 840, tal como se describe en la descripción de las figuras 46A a 46C y 48A a 48C.

50 En otras realizaciones con un compresor de muestras 30, el compresor de muestras no incluye reactivo alguno para la prueba, y se usa solo para proporcionar una presión o para formar un puente sobre una zona de desvío sobre la tira reactiva.

55 A pesar de que los métodos y dispositivos se describen en el presente documento como ensayos en sándwich, los métodos y dispositivos de la presente invención se pueden usar igualmente en ensayos competitivos. En estos ensayos competitivos, el conjugado preferiblemente incluye un analito o un análogo del analito, en lugar de un socio de unión de analito, unido a un marcador o, como alternativa, el segundo socio de unión se sustituye por el analito o análogo del analito. Un resultado positivo es indicado entonces por la falta o la presencia del marcador en la zona de prueba de la tira reactiva.

60 Por consiguiente, ha de entenderse que las realizaciones de la invención que se describe en el presente documento son meramente ilustrativas de la aplicación de los principios de la invención. La referencia en el presente documento a detalles de las realizaciones ilustradas no tiene por objeto limitar el alcance de las reivindicaciones, que enuncian

por sí mismas las características que se consideran esenciales para la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de flujo lateral para detectar un analito en una muestra, que comprende:
 - 5 un compresor de muestras;
una tira reactiva que comprende una zona de prueba y una zona de desvío aguas arriba de la zona de prueba, en donde la zona de desvío interrumpe el flujo lateral sobre la tira reactiva;
un conjugado que comprende un primer socio de unión para el analito y un marcador; y
un segundo socio de unión para el analito; y
 - 10 una zona de aplicación de muestra donde se aplica una muestra al dispositivo de flujo lateral, en donde la zona de aplicación de muestra está ubicada en una ubicación que está seleccionada de entre el grupo que consiste en: i) sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección; ii) sobre el compresor de muestras; y iii) sobre un colector de muestras que comprende una porción de recogida de muestras para la recogida de la muestra; en donde un componente que está seleccionado de entre el grupo que consiste en el conjugado, el segundo socio de unión y tanto el conjugado como el segundo socio de unión no está ubicado sobre la tira reactiva antes
 - 15 del uso del dispositivo de flujo lateral; y
en donde el compresor de muestras crea un puente por encima de la zona de desvío para desviar el flujo sobre el compresor de muestras y devolver el flujo a la tira reactiva en el extremo de la zona de desvío.
- 20 2. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, cuando la zona de aplicación de muestra se encuentra sobre un colector de muestras, el colector de muestras está ubicado entre el compresor de muestras y la tira reactiva en una pila vertical.
- 25 3. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la zona de desvío comprende: (A) una barrera física que detiene o retarda el flujo en una dirección lateral sobre la tira reactiva, (B) una barrera química que detiene o retarda el flujo en una dirección lateral sobre la tira reactiva, o (C) una separación que detiene el flujo en una dirección lateral sobre la tira reactiva.
- 30 4. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la zona de desvío comprende una barrera física que detiene o retarda el flujo en una dirección lateral sobre la tira reactiva y en el que la barrera física comprende componentes encapsulados y la barrera física se disuelve tras la aplicación de un medio de elución.
- 35 5. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compresor de muestras comprende una almohadilla y en el que el conjugado o el segundo socio de unión están ubicados sobre la almohadilla antes del uso del dispositivo de flujo lateral.
- 40 6. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compresor de muestras comprende una almohadilla que comprende un primer socio de unión de control que está ubicado sobre la almohadilla y un segundo socio de unión de control que está inmovilizado en una zona de control de la tira reactiva, en donde el primer socio de unión de control es un socio de unión para el segundo socio de unión de control.
- 45 7. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dispositivo de flujo lateral está formado de tal modo que solo se logra un resultado positivo mediante la captura del analito en la zona de prueba a través de la formación de un complejo entre el analito, el primer socio de unión y el segundo socio de unión.
- 50 8. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la zona de prueba no comprende molécula alguna que se una específicamente al analito.
9. El dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo socio de unión comprende una marca y la zona de prueba comprende un socio de unión inmovilizado de la marca.
10. Un método de realización un ensayo de una muestra sobre un dispositivo de flujo lateral que comprende una tira reactiva y un compresor de muestras, comprendiendo el método las etapas de:
 - 55 a) colocar una muestra sobre el dispositivo de flujo lateral;
 - b) interrumpir el flujo lateral sobre la tira reactiva mediante la inclusión de una zona de desvío sobre la tira reactiva;
 - c) desviar el flujo interrumpido al compresor de muestras mediante la aplicación de una presión al dispositivo usando el compresor de muestras; y
 - 60 d) devolver el flujo a la tira reactiva en el extremo de la zona de desvío.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que, en la etapa a), la muestra se coloca sobre una zona de aplicación de muestra que está ubicada en una ubicación que está seleccionada de entre el grupo que consiste en: i) sobre la tira reactiva aguas arriba de una zona de detección; ii) sobre el compresor de muestras; y iii) sobre un colector de muestras que comprende una porción de recogida de muestras para la recogida de la muestra.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que, cuando la muestra se coloca sobre un colector de muestras, el colector de muestras está ubicado entre el compresor de muestras y la tira reactiva en una pila vertical; y
5 en el que, de forma opcional, la etapa a) comprende adicionalmente colocar una almohadilla con un socio de unión para un analito sobre la pila vertical y en el que en la etapa d) al menos una porción del socio de unión se transfiere a la tira reactiva.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la zona de desvío comprende una barrera física que detiene o retarda el flujo en una dirección lateral sobre la tira reactiva; y
10 en el que, de forma opcional, la barrera física comprende al menos un componente encapsulado, que comprende adicionalmente la etapa de disolver la barrera física para liberar el componente encapsulado.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la zona de desvío comprende una separación que detiene el flujo en una dirección lateral sobre la tira reactiva.
15
15. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el compresor de muestras comprende un componente que está seleccionado de entre el grupo que consiste en un primer socio de unión, un segundo socio de unión y tanto el primer socio de unión como el segundo socio de unión.

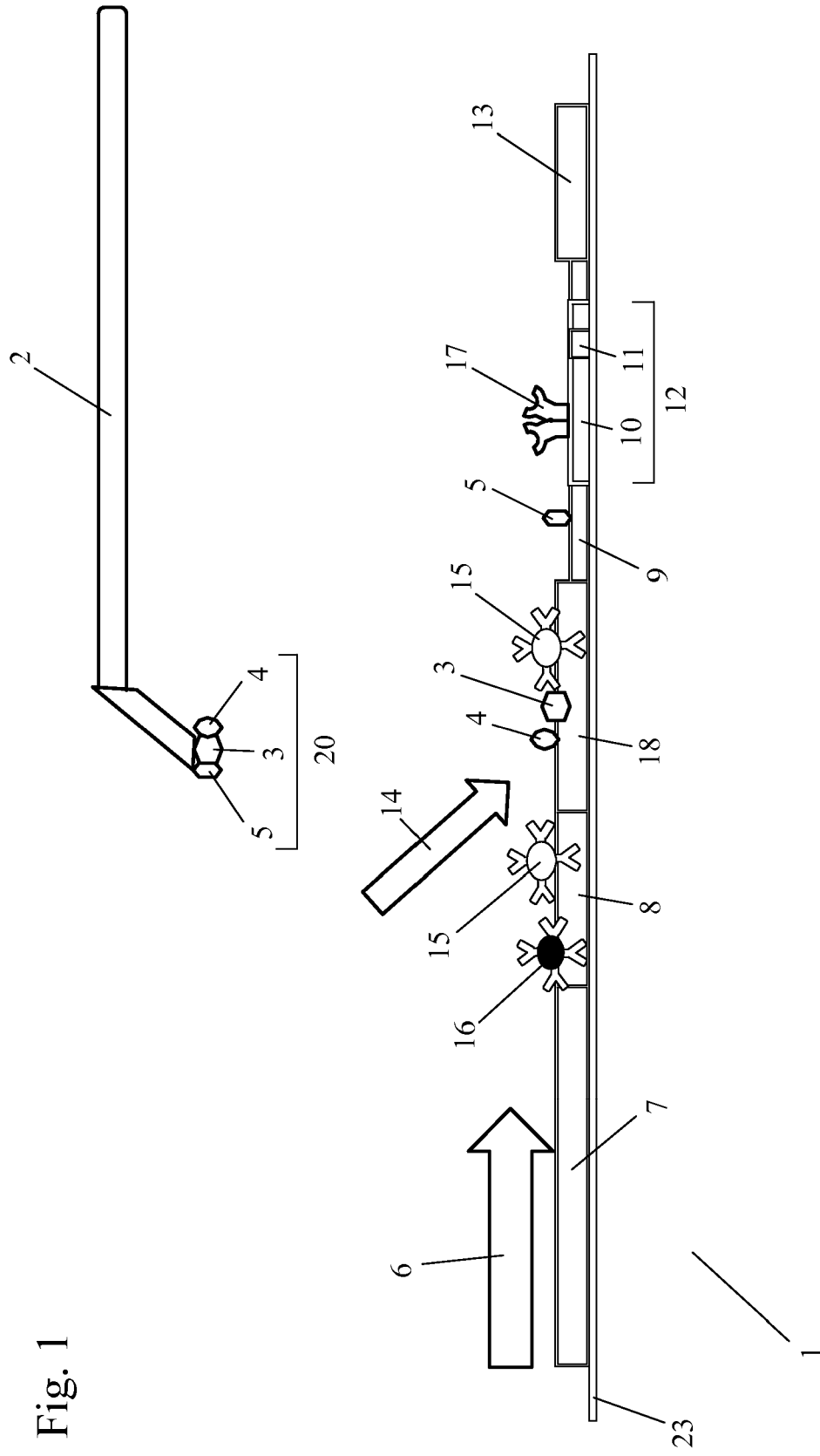


Fig. 1

Fig. 2A

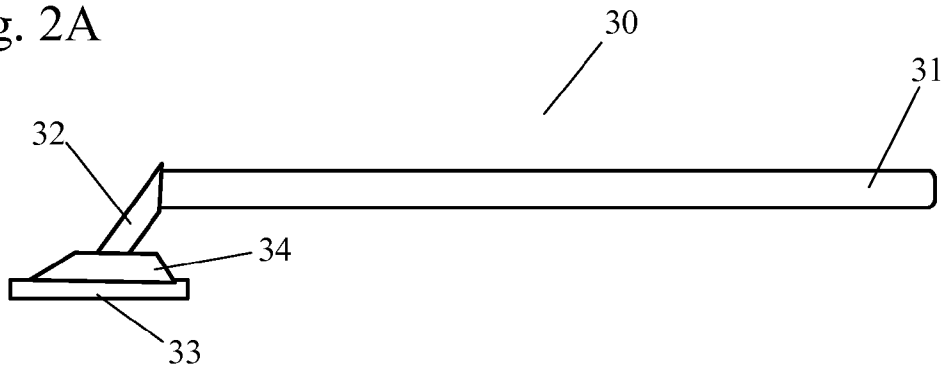


Fig. 2B

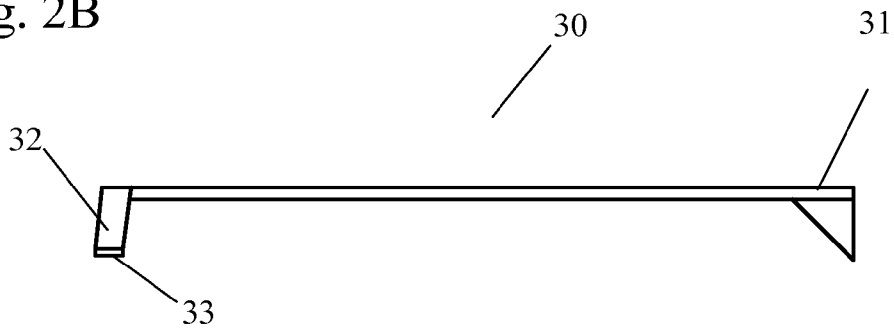


Fig. 2C

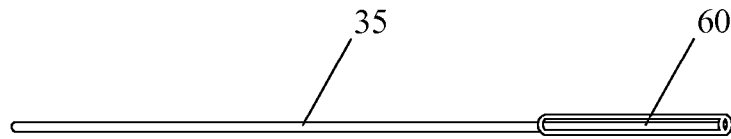


Fig. 3B

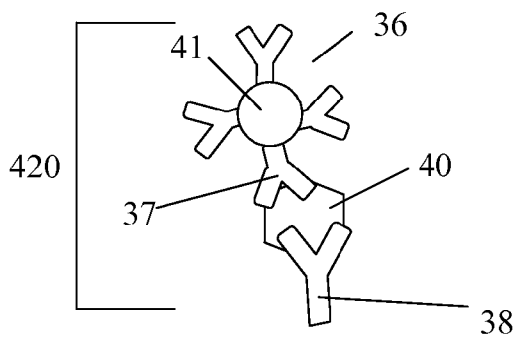


Fig. 4B

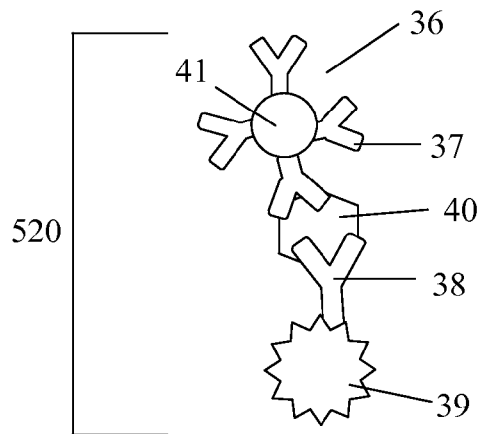


Fig. 3A

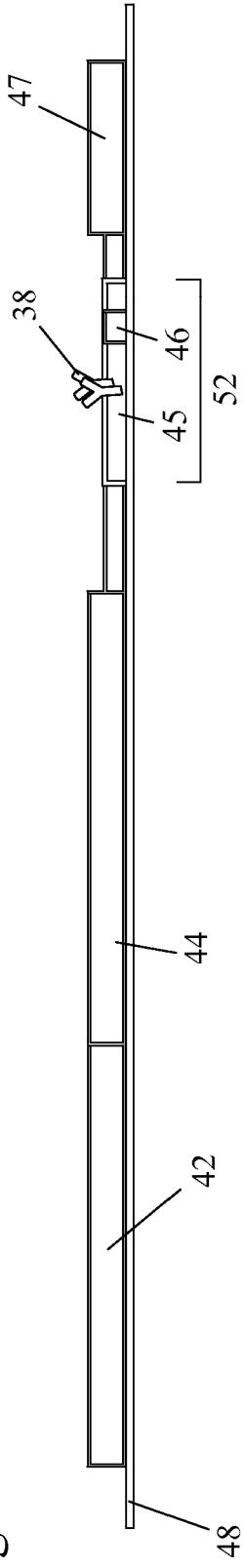


Fig. 3C

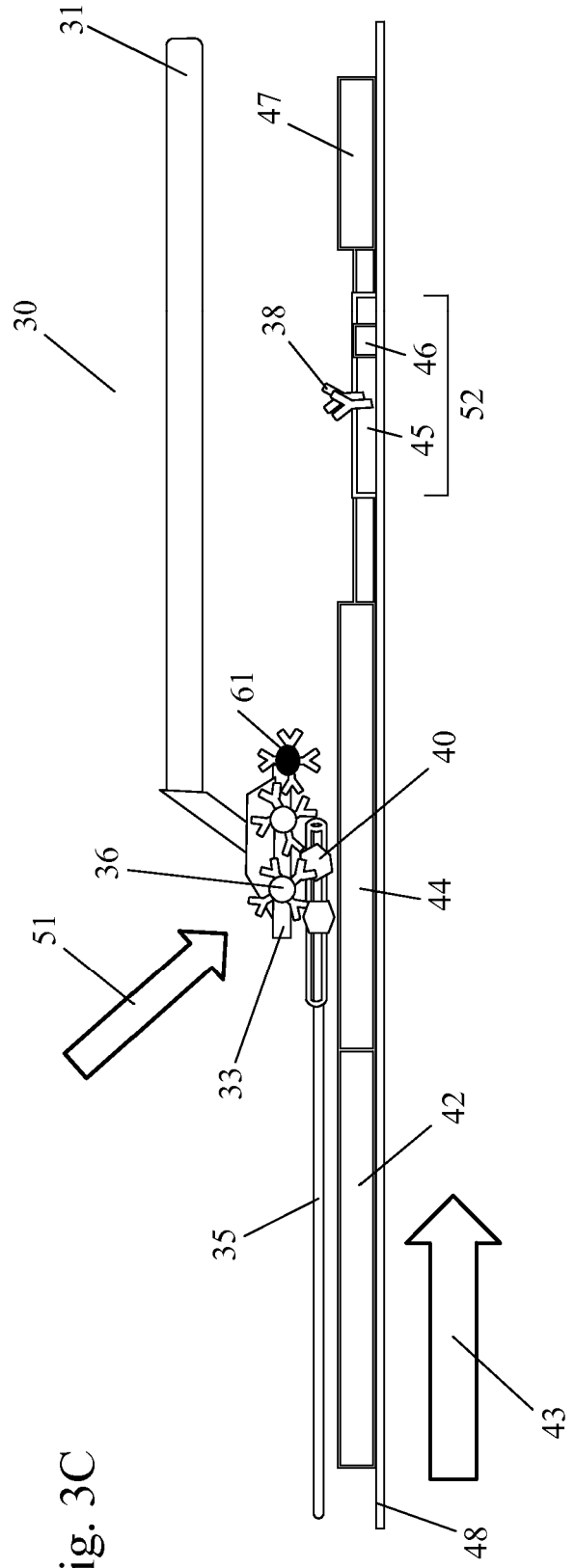


Fig. 4A

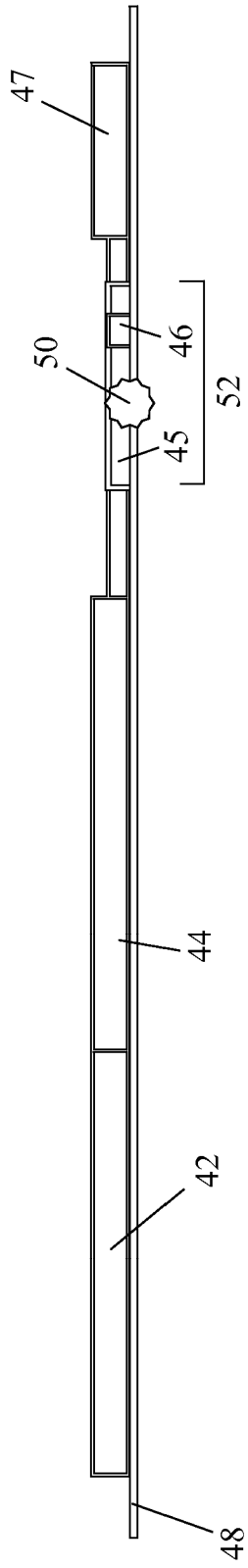


Fig. 4C

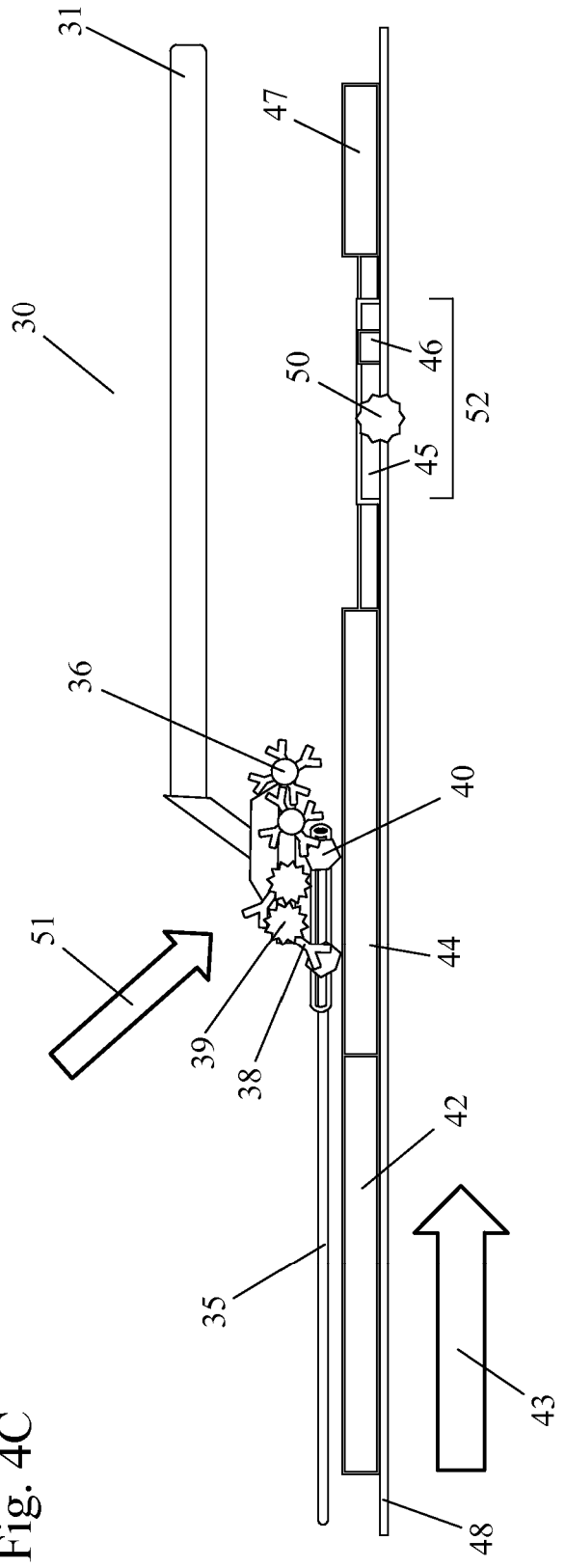


Fig. 5A

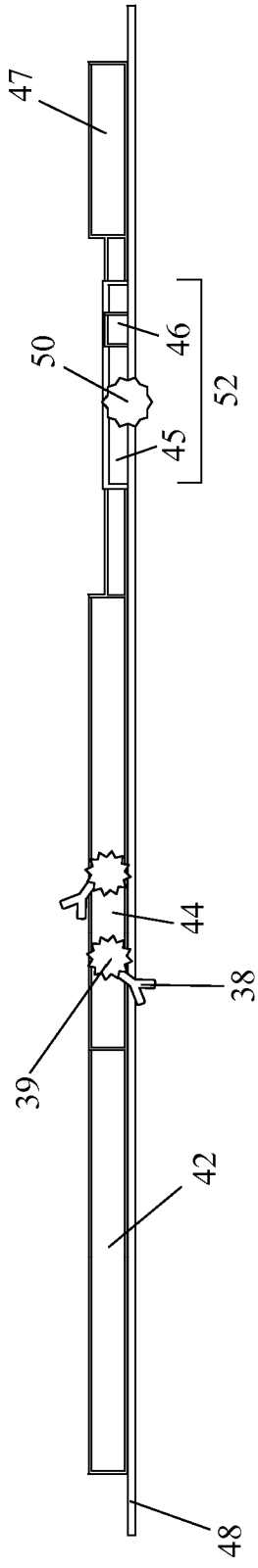


Fig. 5B

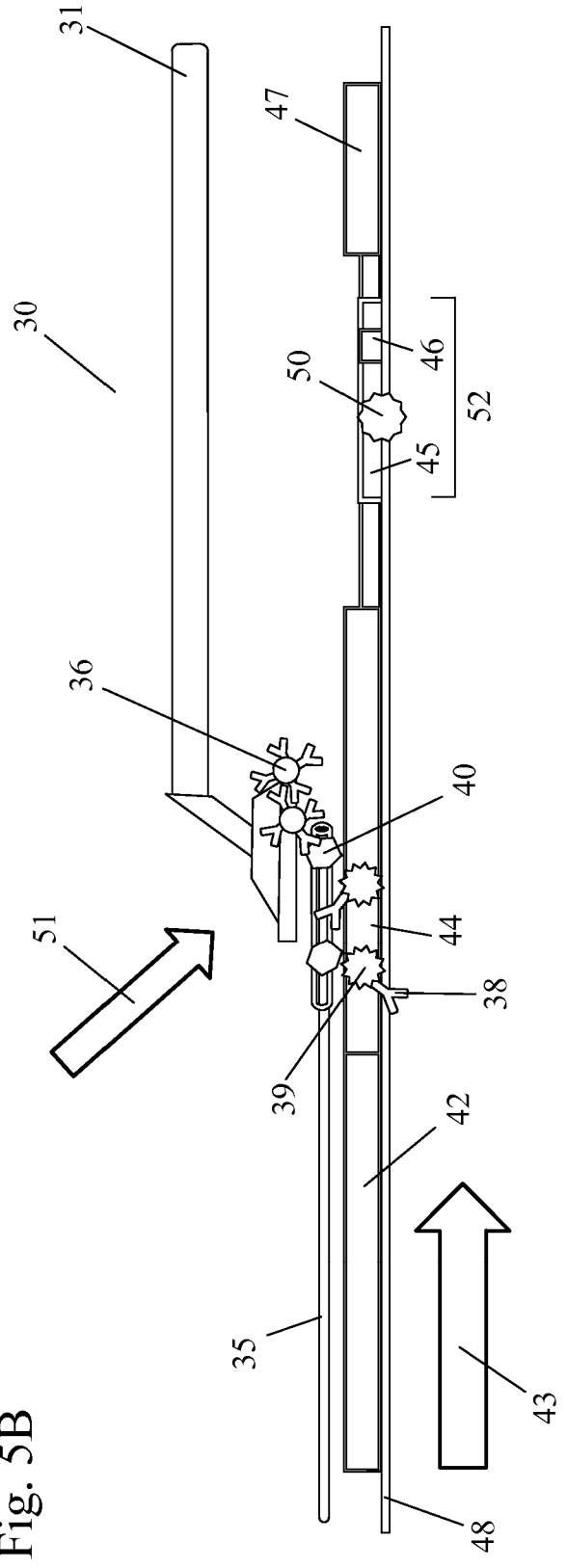


Fig. 6A

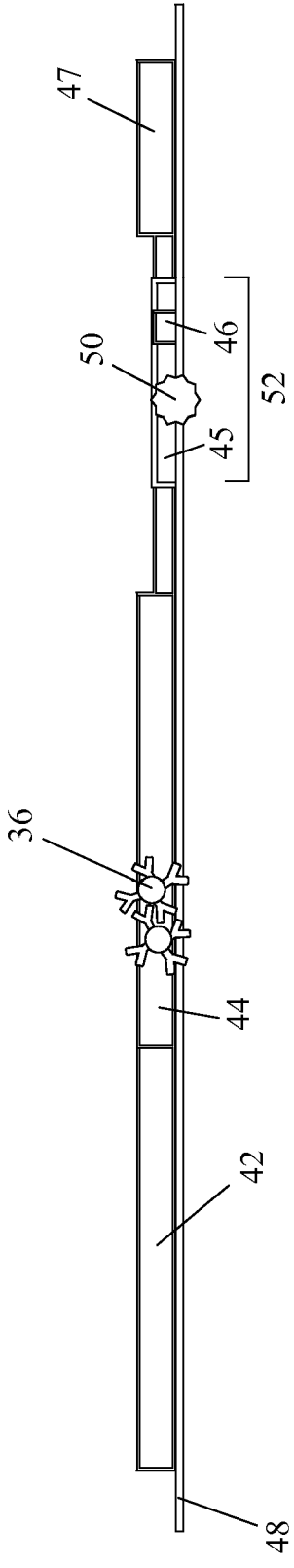
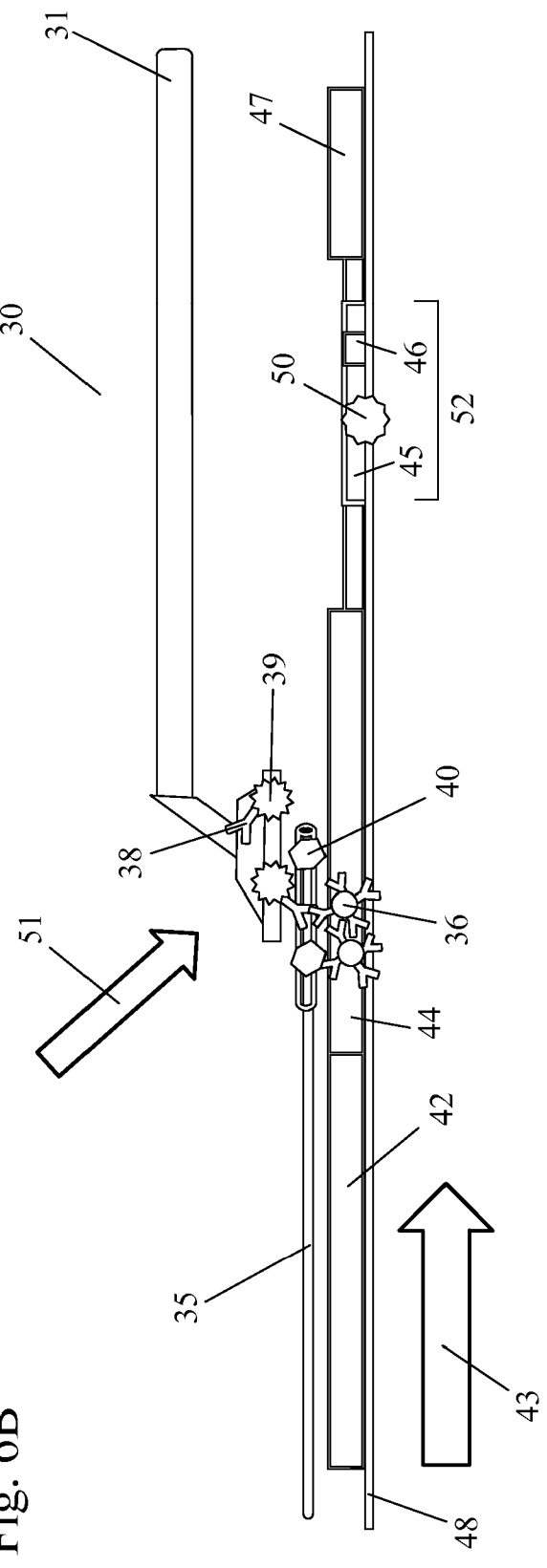
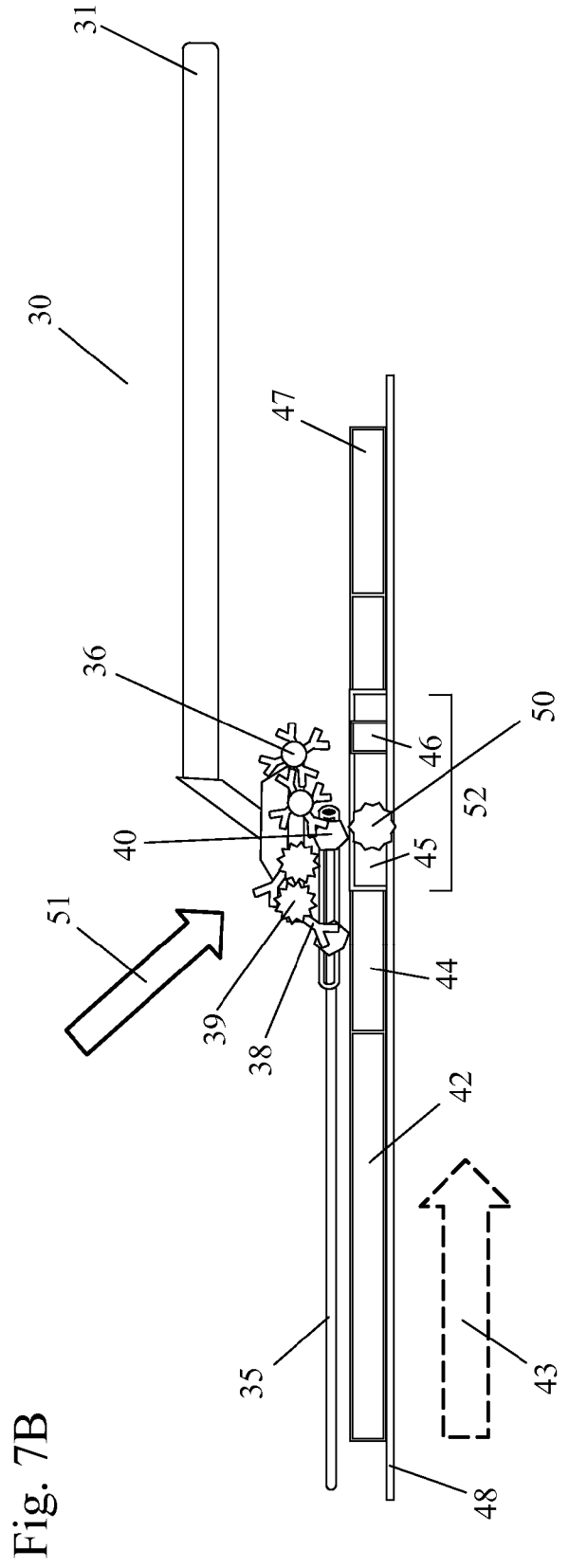
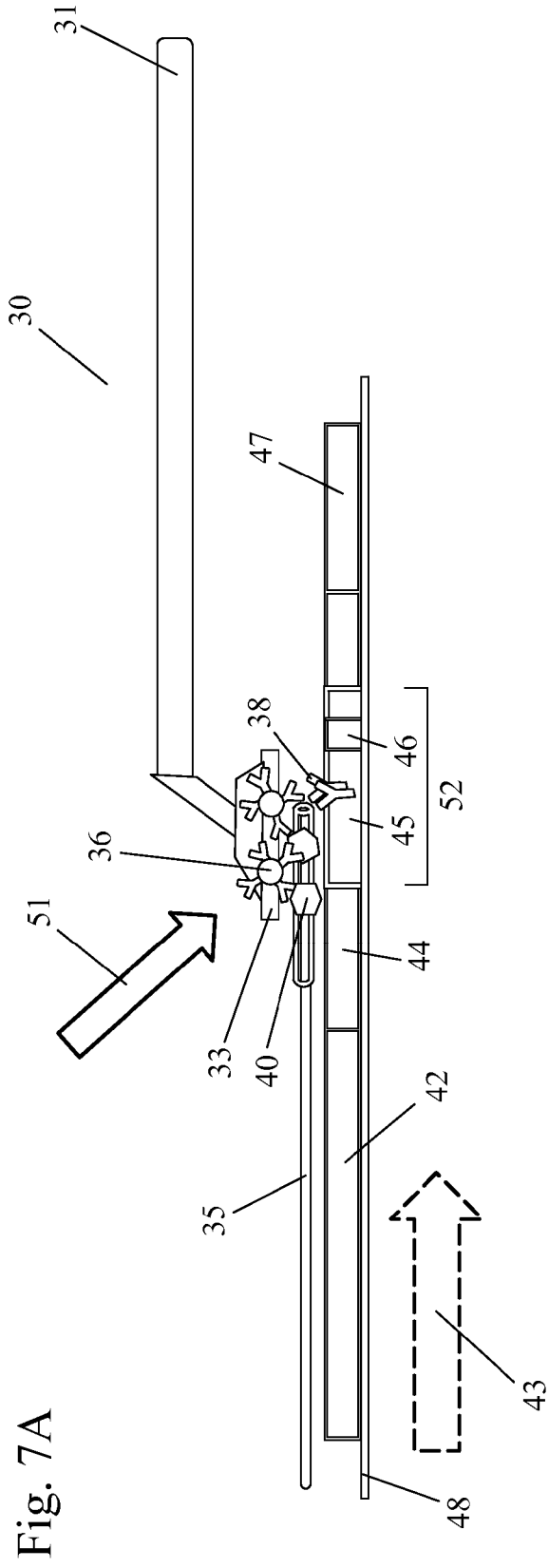


Fig. 6B





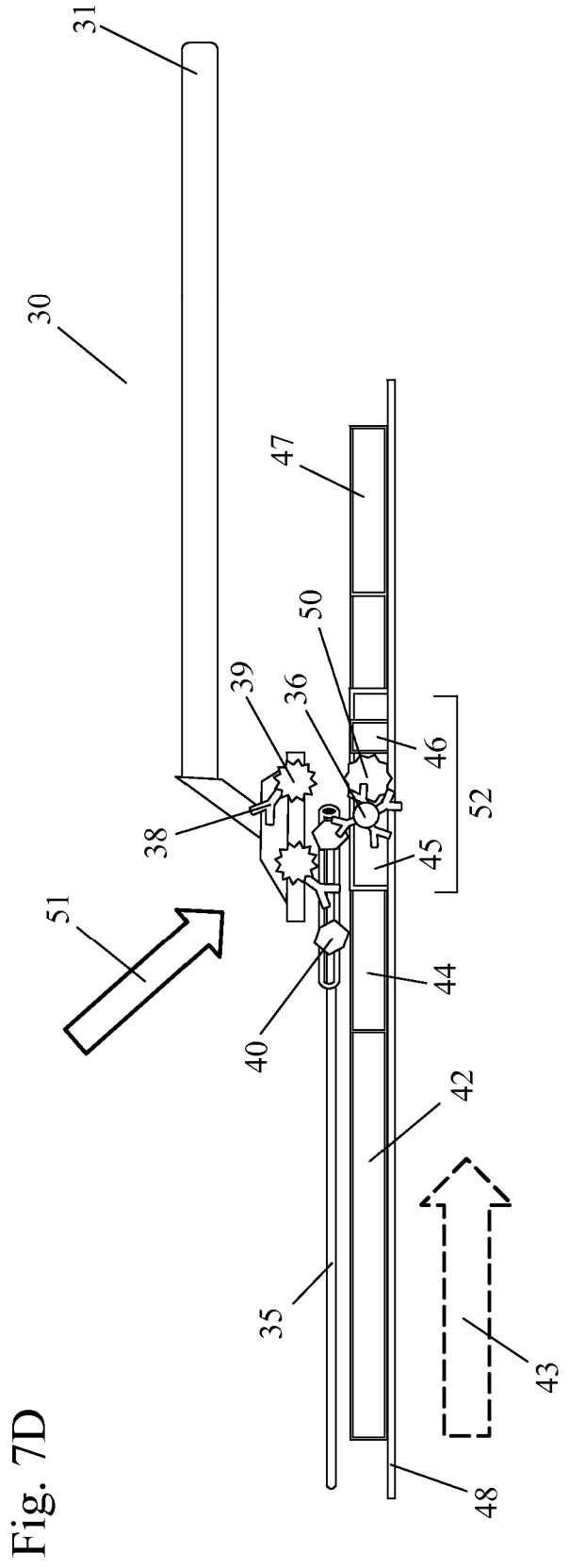
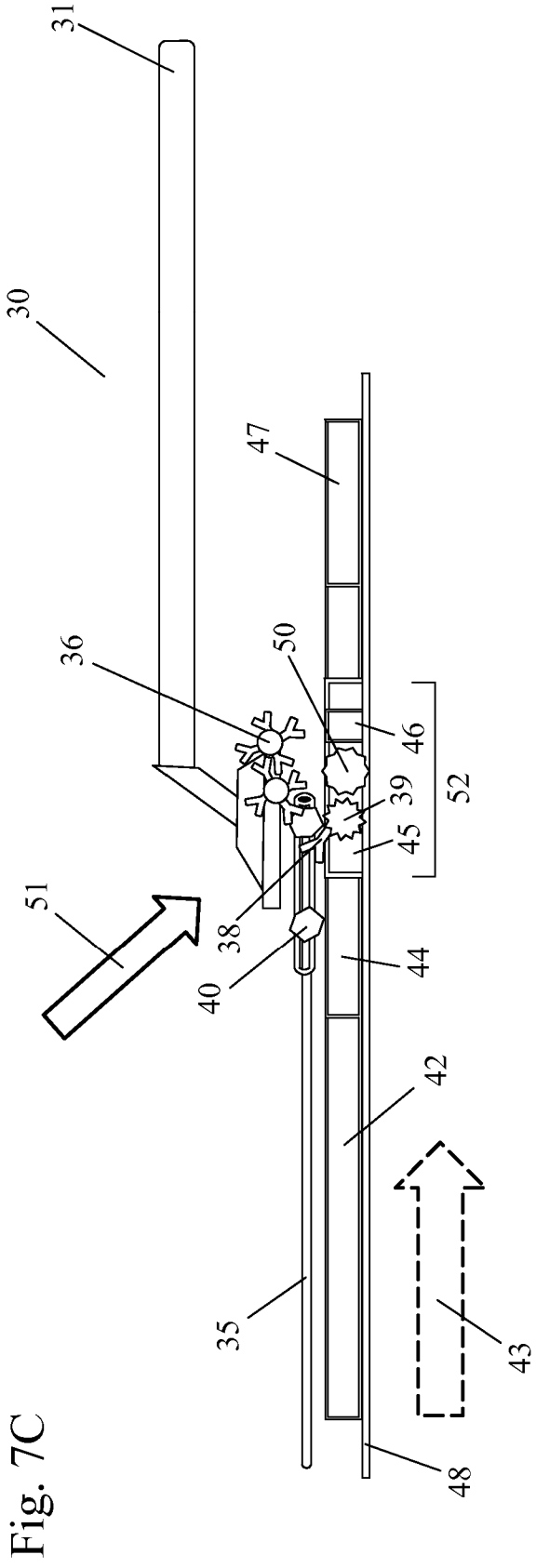


Fig. 8A

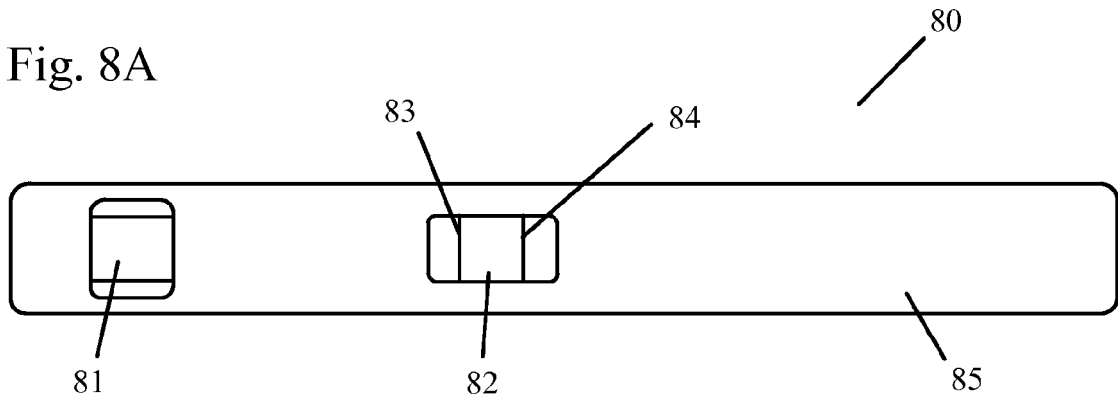


Fig. 8B

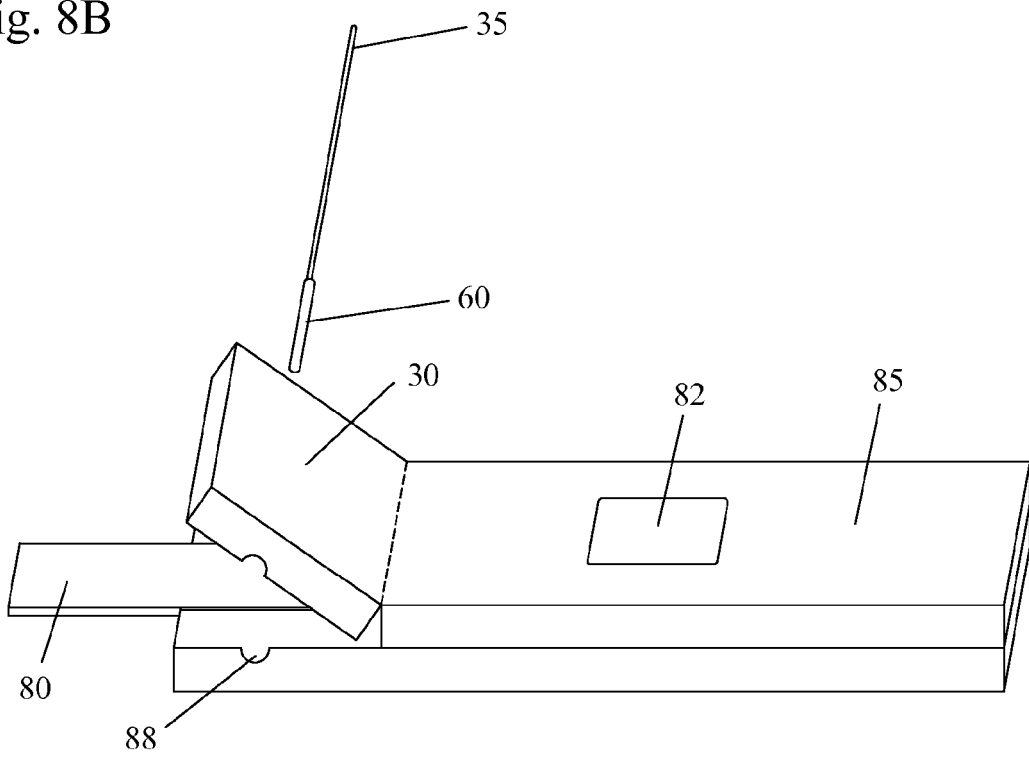


Fig. 9

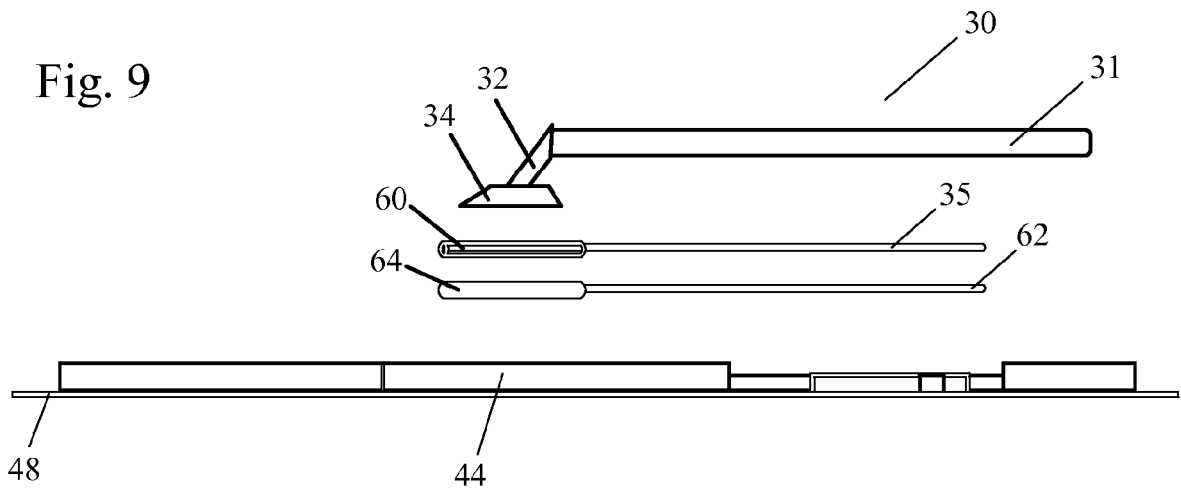


Fig. 10

TÉCNICA ANTERIOR

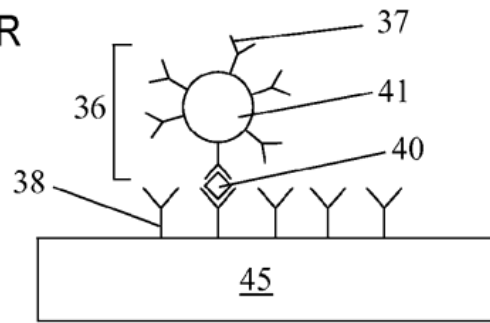


Fig. 11

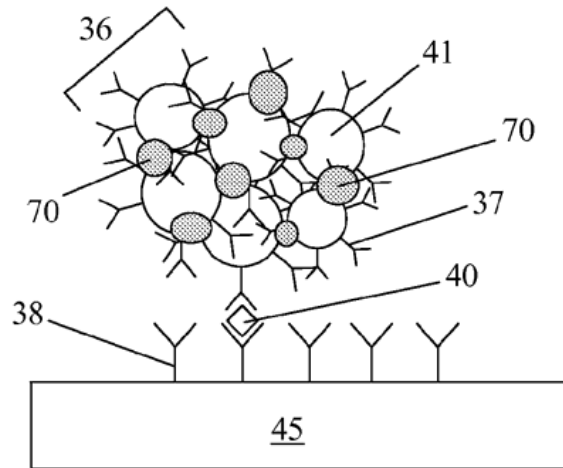


Fig. 12

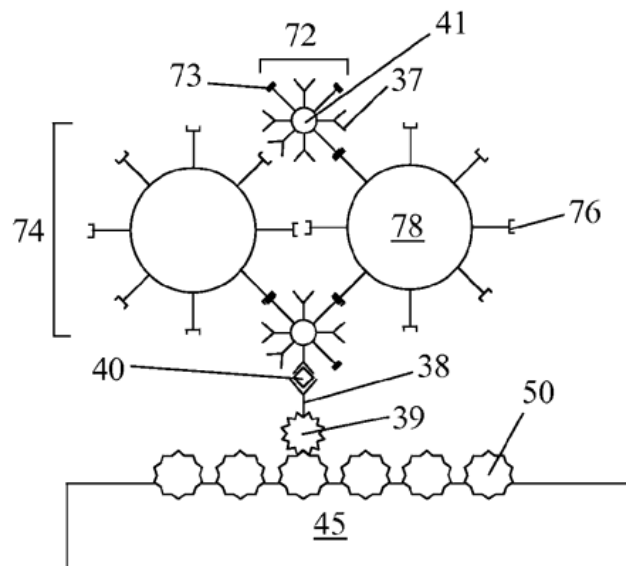
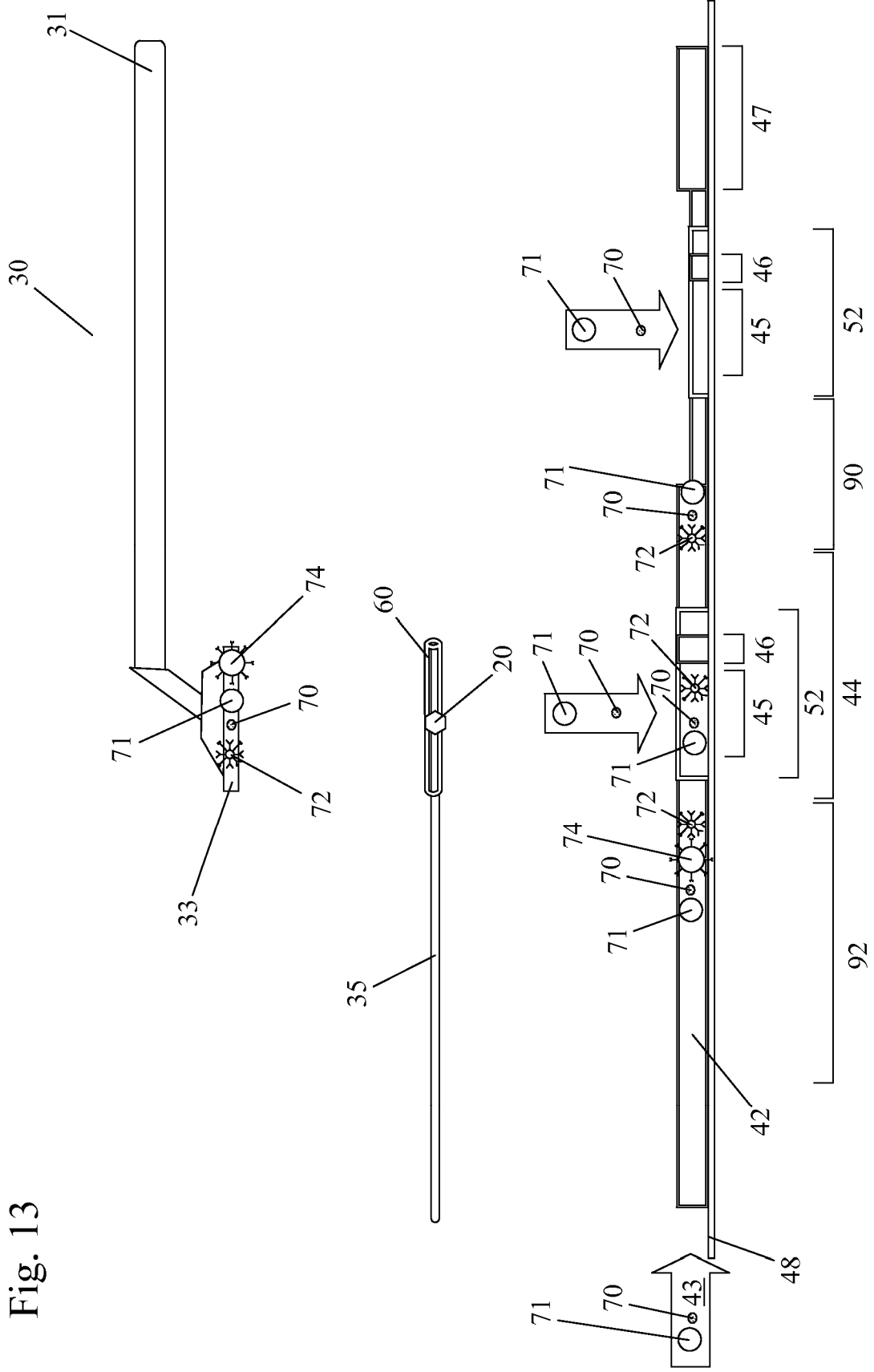


Fig. 13



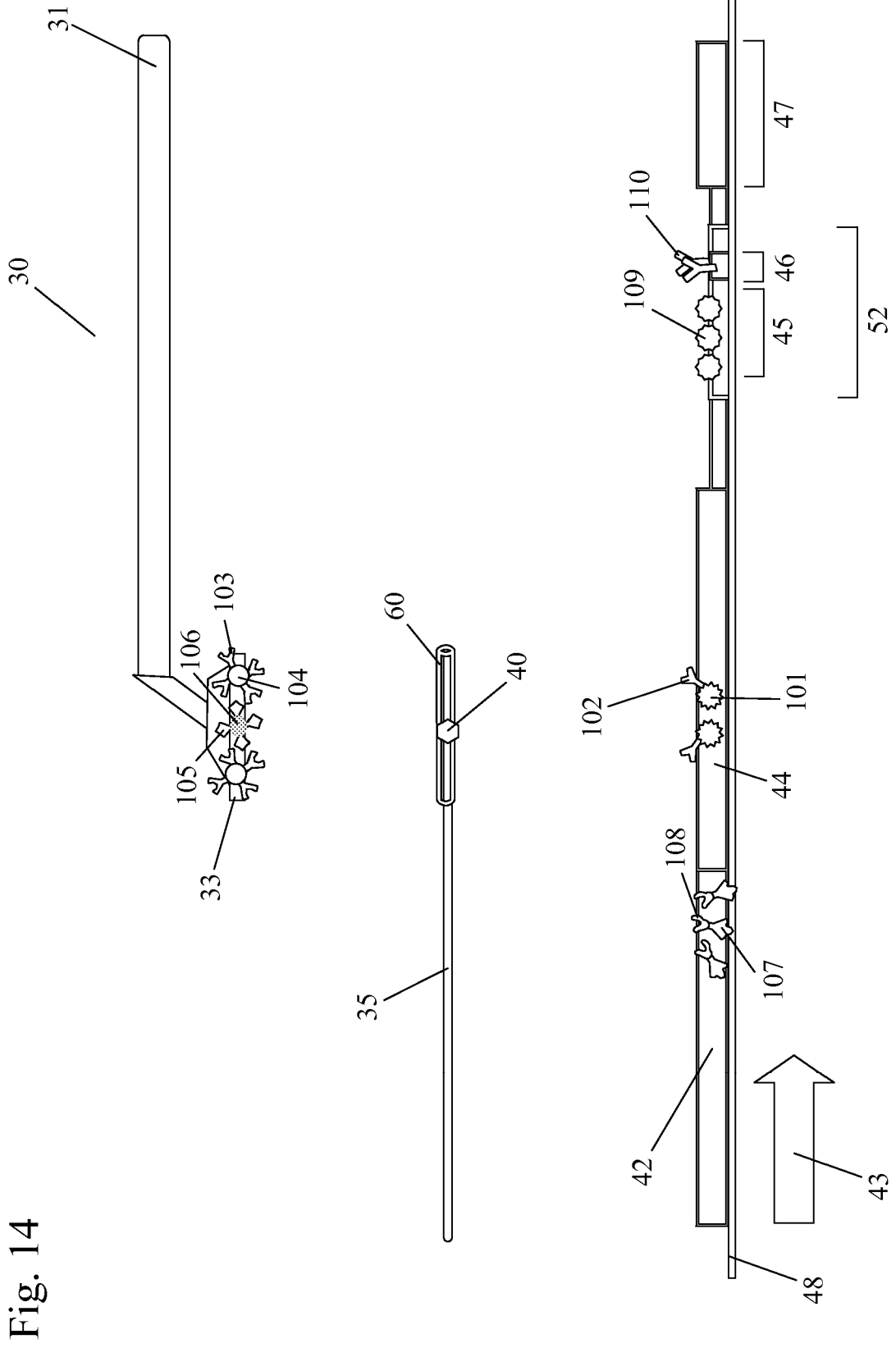


Fig. 15A

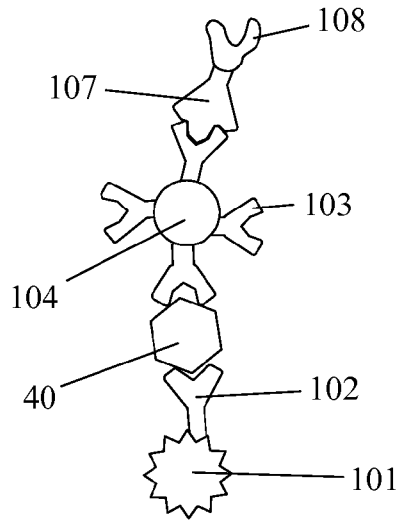


Fig. 15B

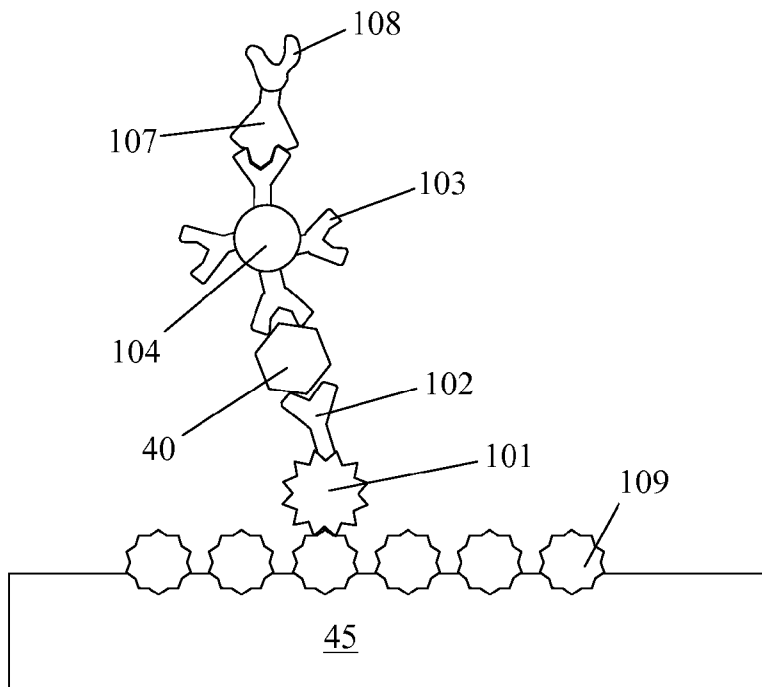


Fig. 15C

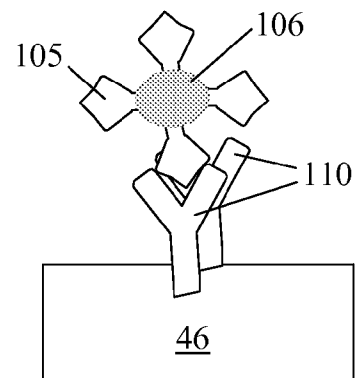


Fig. 16

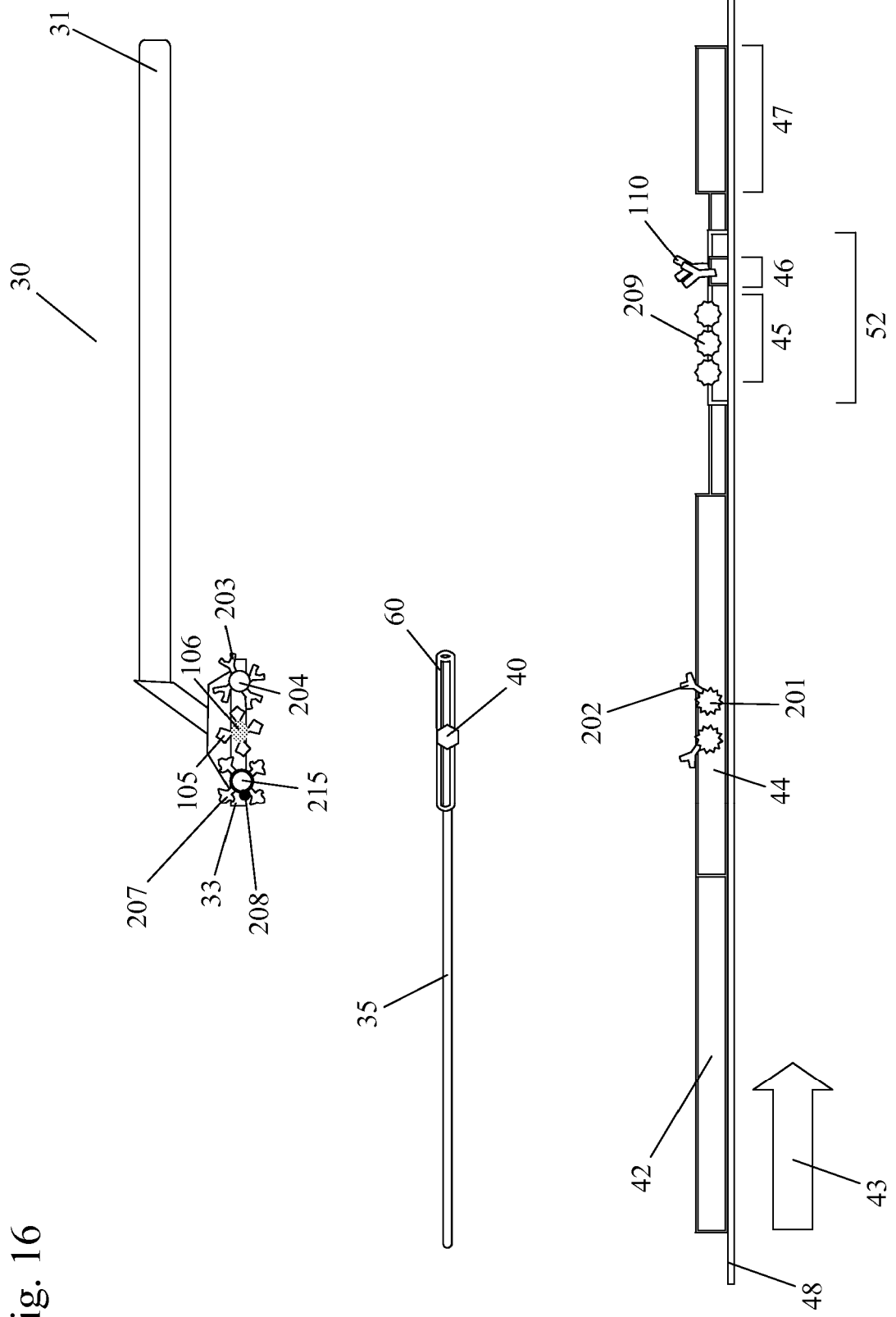


Fig. 17A

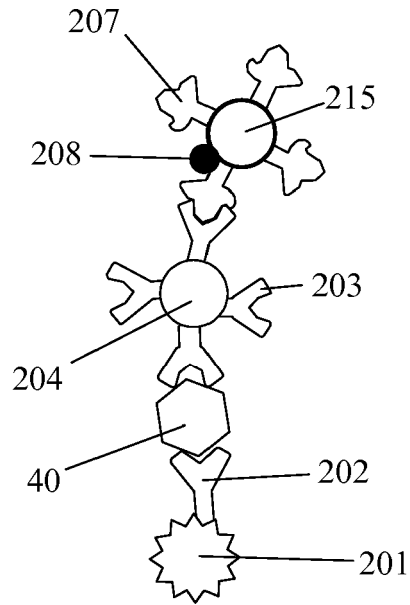


Fig. 17B

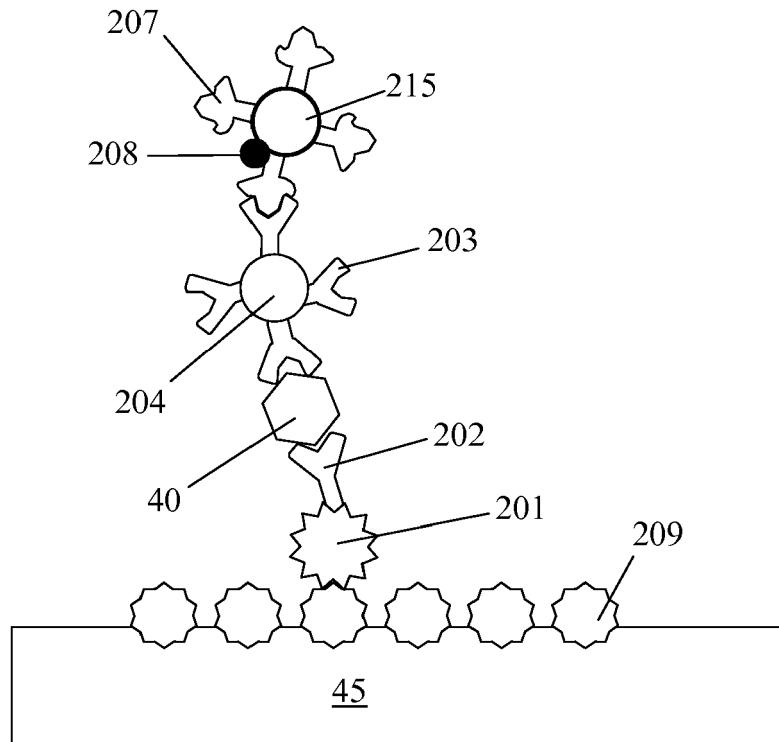


Fig. 18

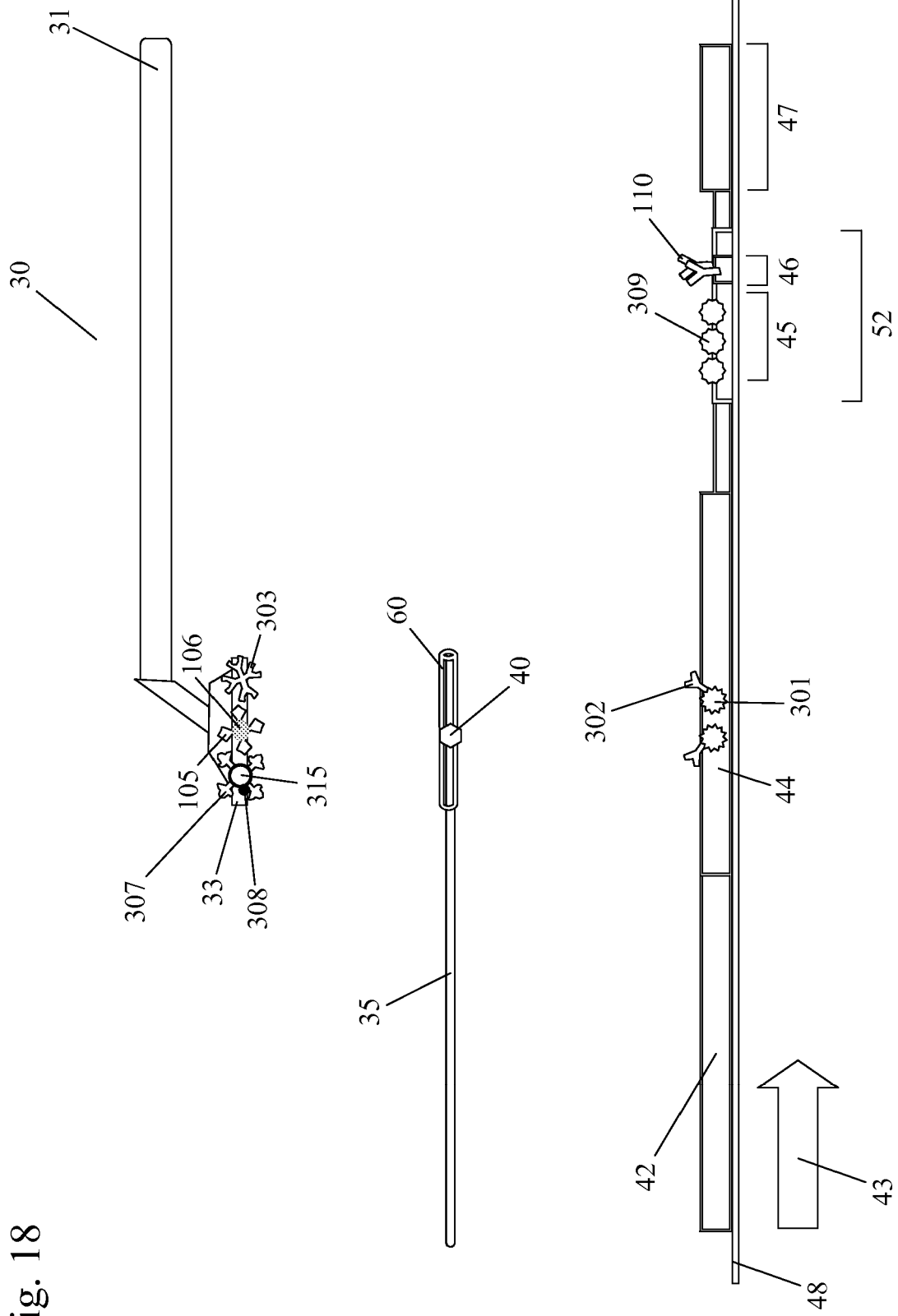


Fig. 19A

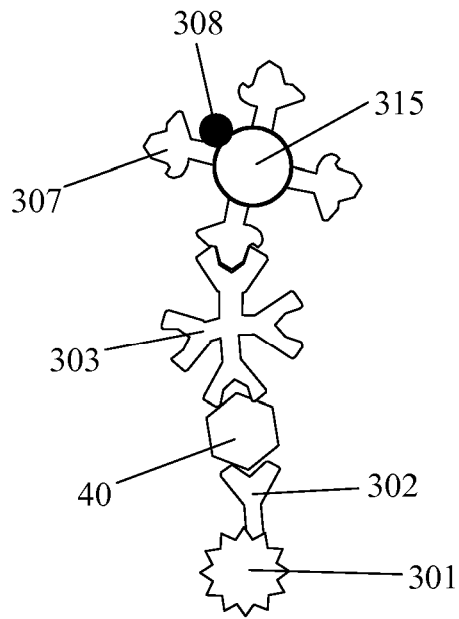


Fig. 19B

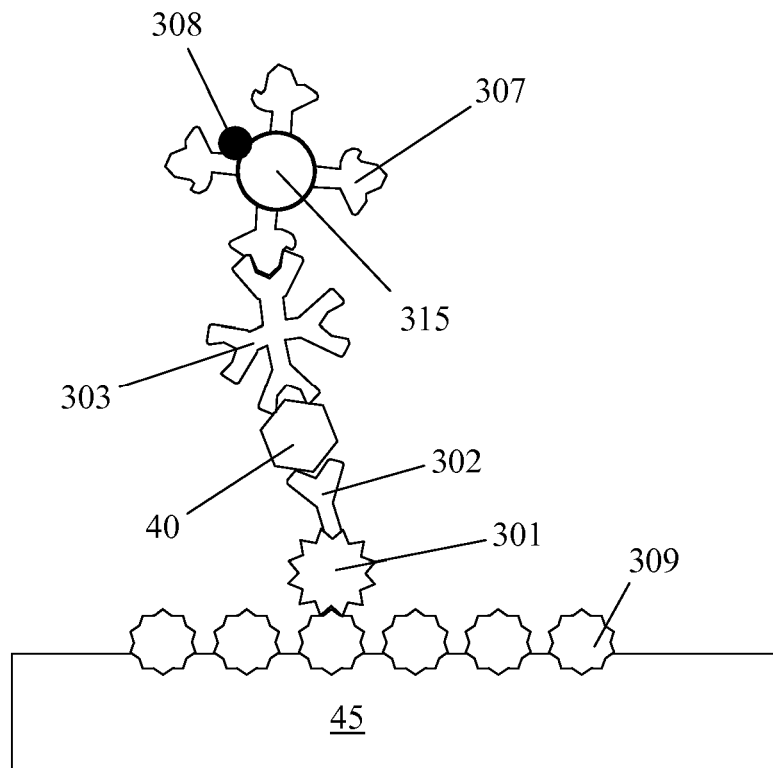


Fig. 20A

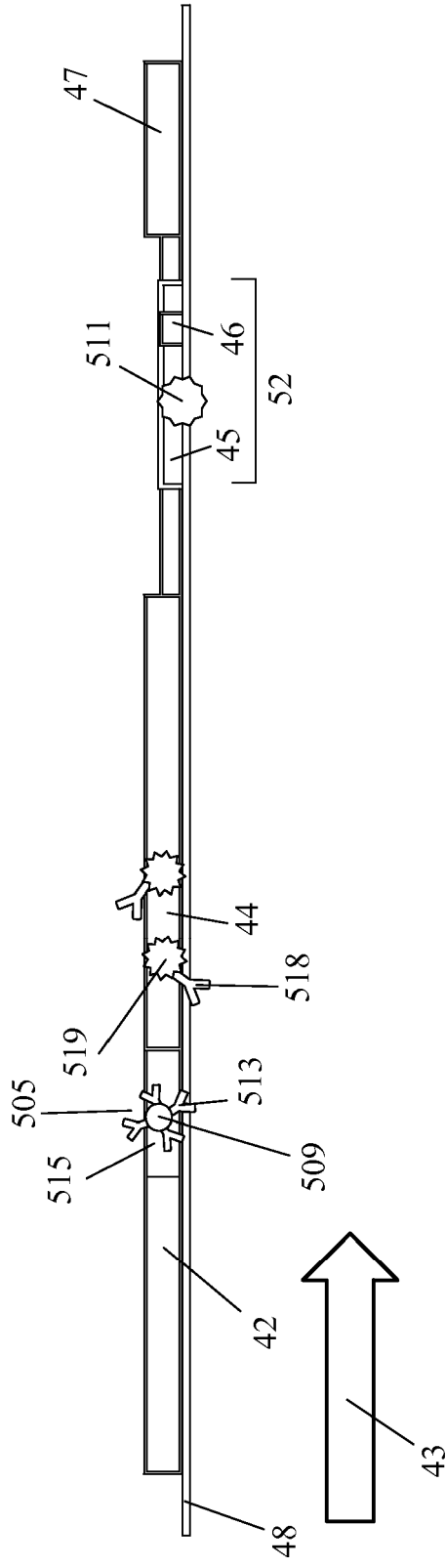


Fig. 20B

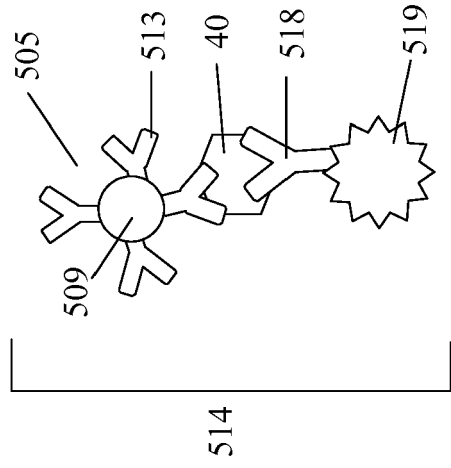


Fig. 21A

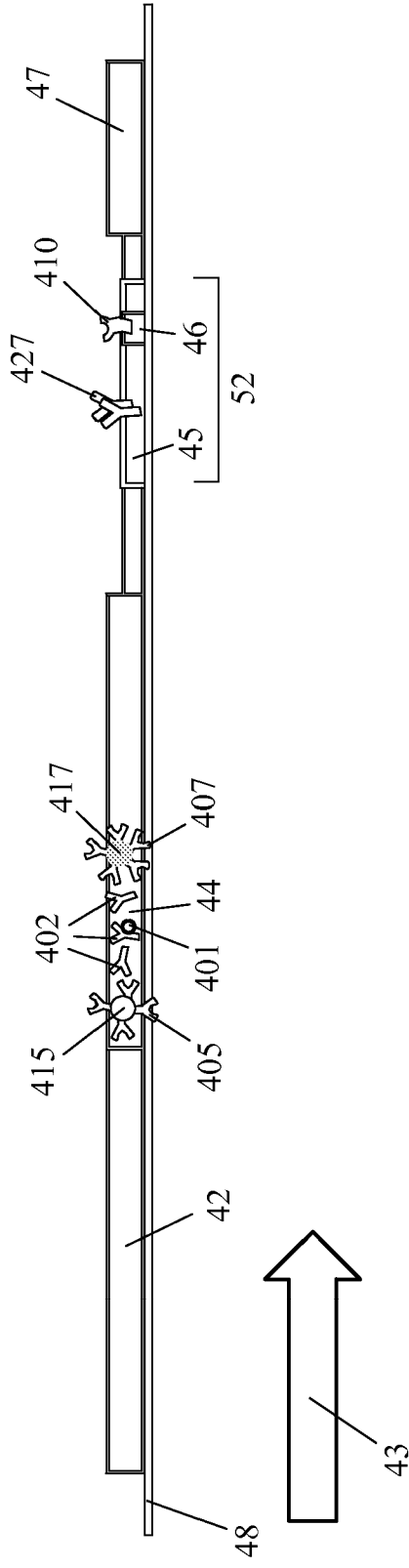


Fig. 21B

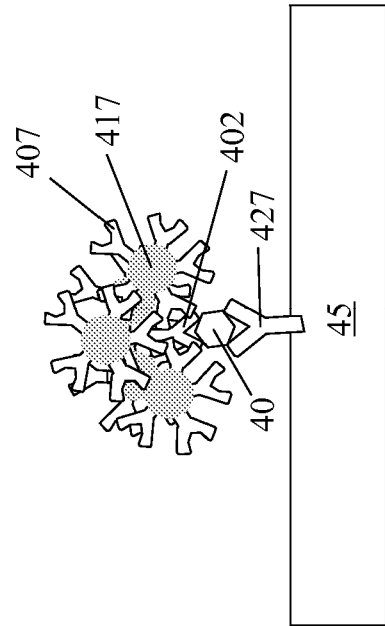


Fig. 21C

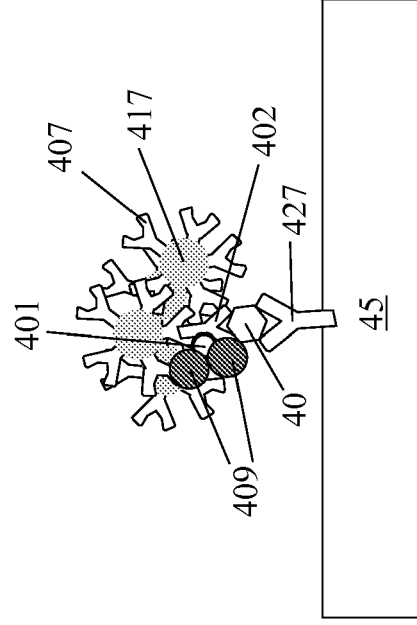


Fig. 22A

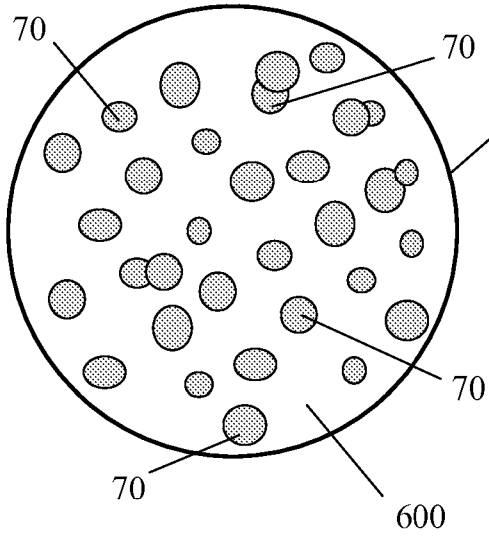


Fig. 22B

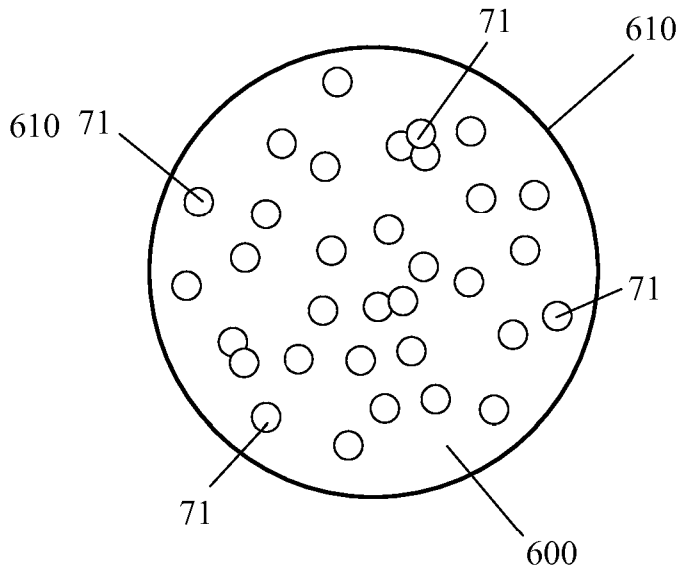


Fig. 22C

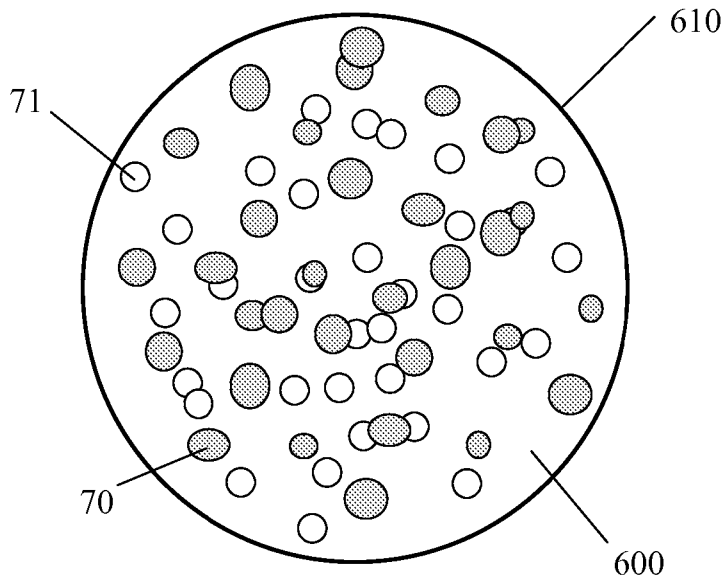


Fig. 23A

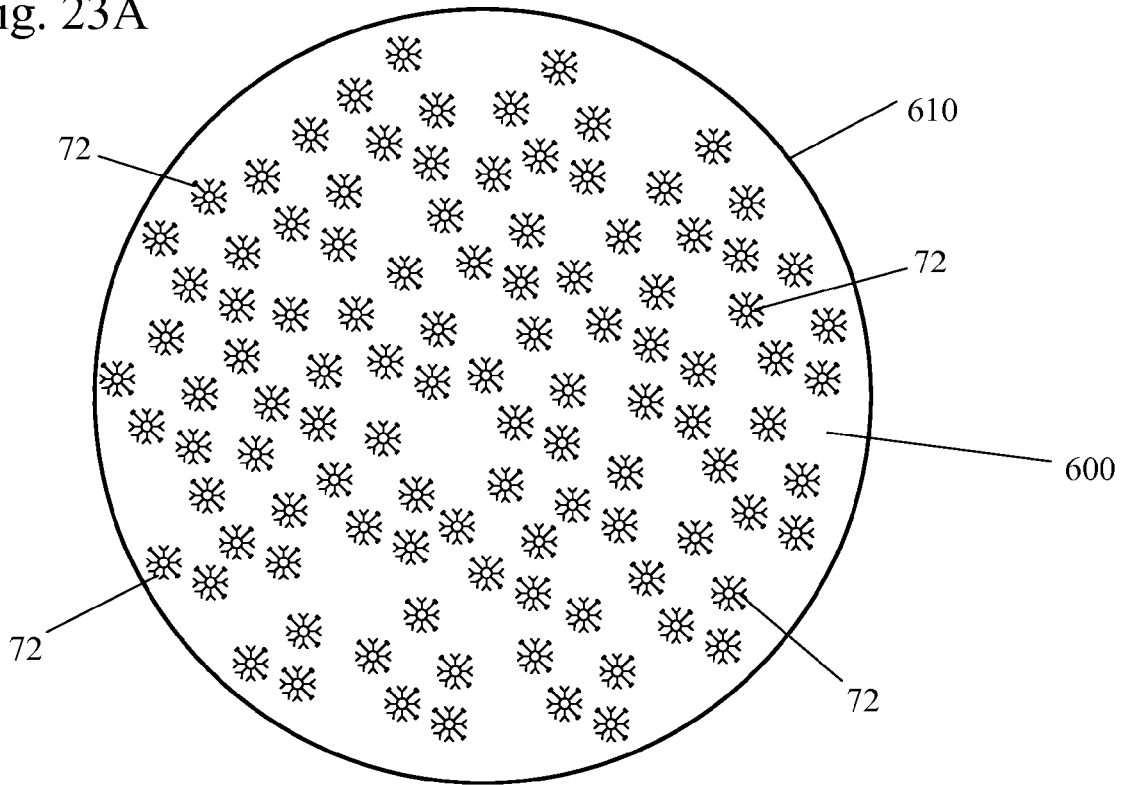


Fig. 23B

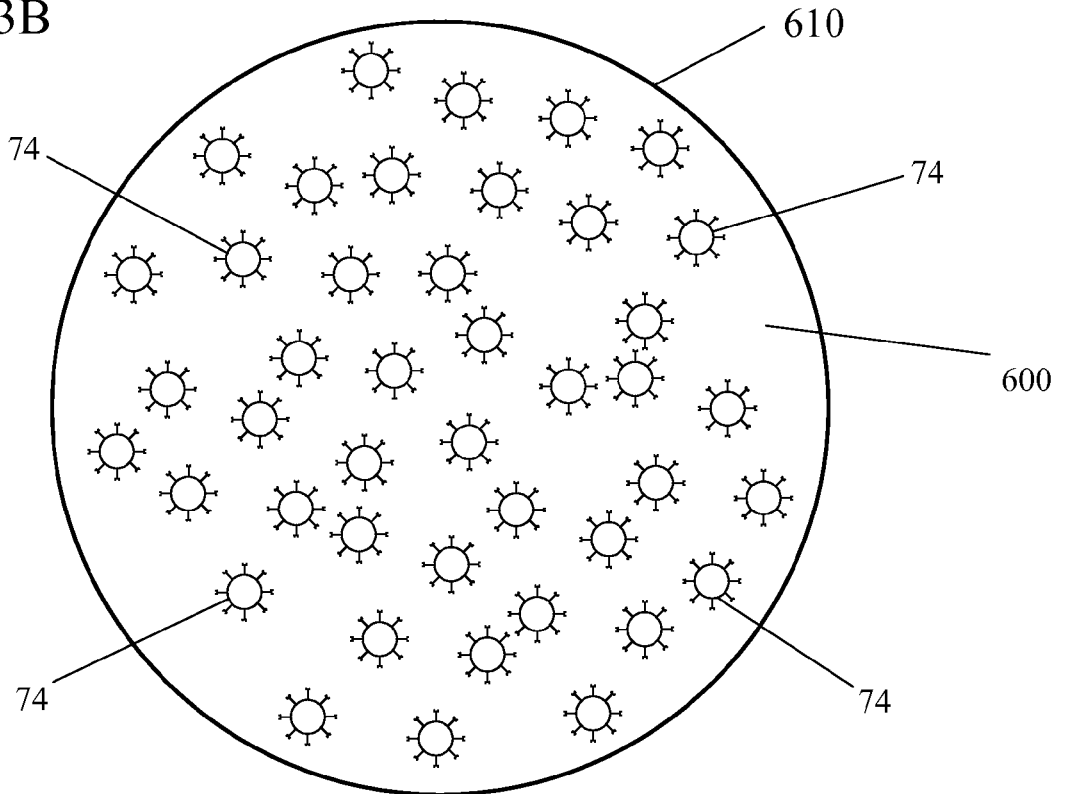


Fig. 24A

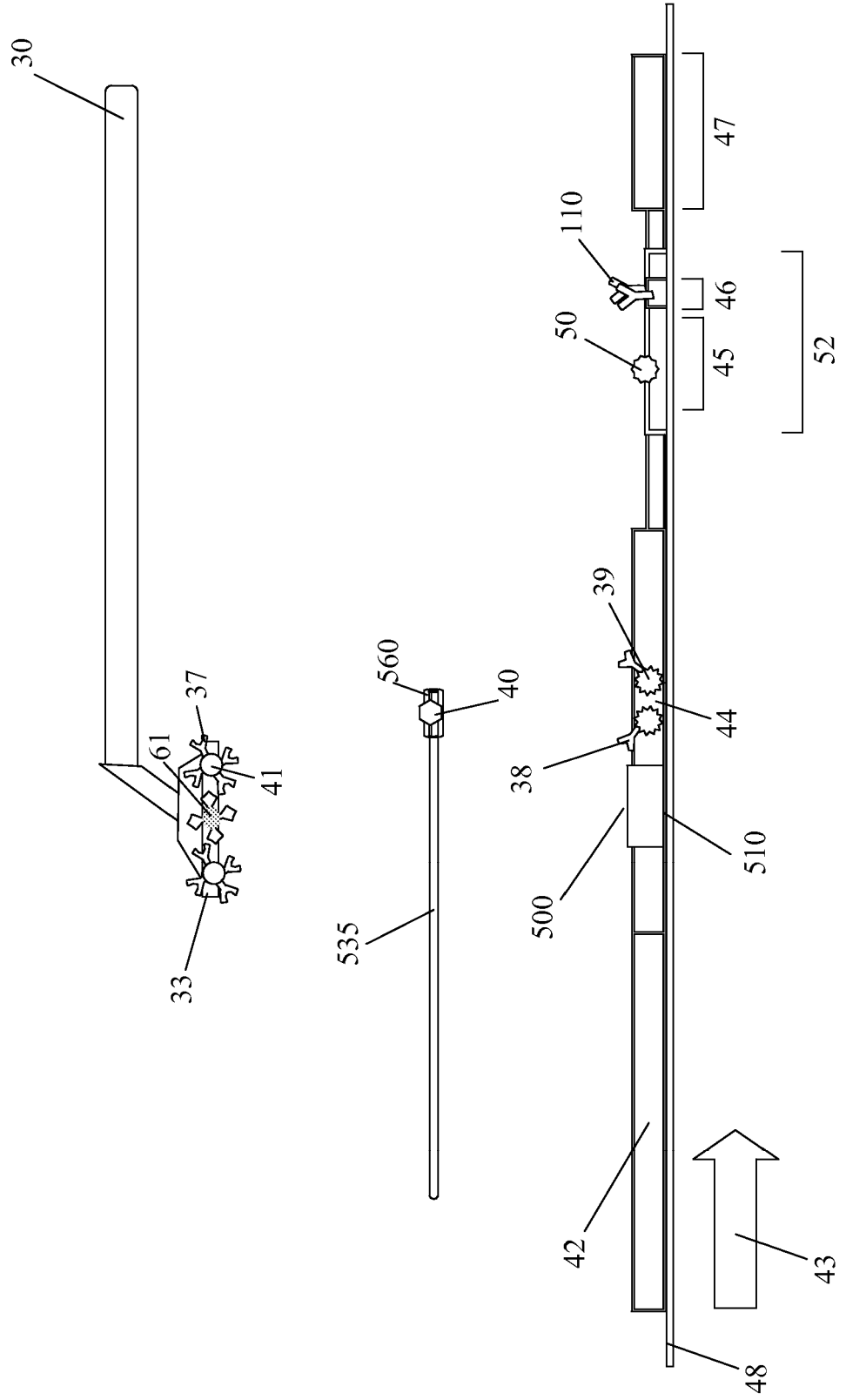


Fig. 24B

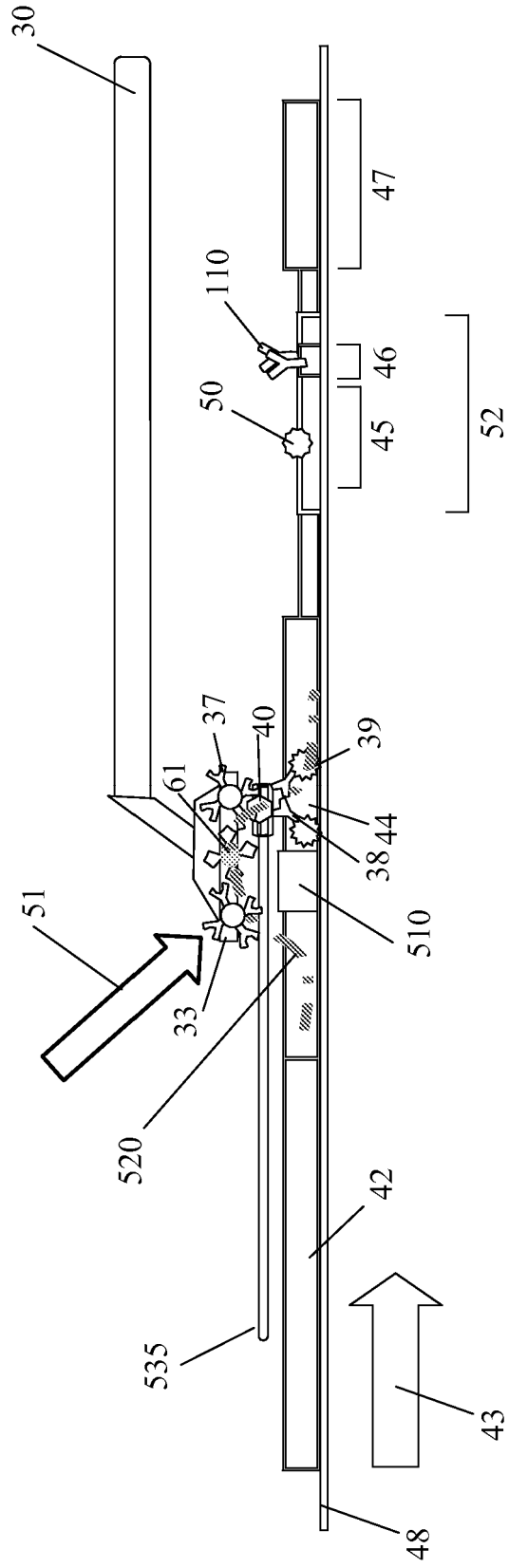


Fig. 25A

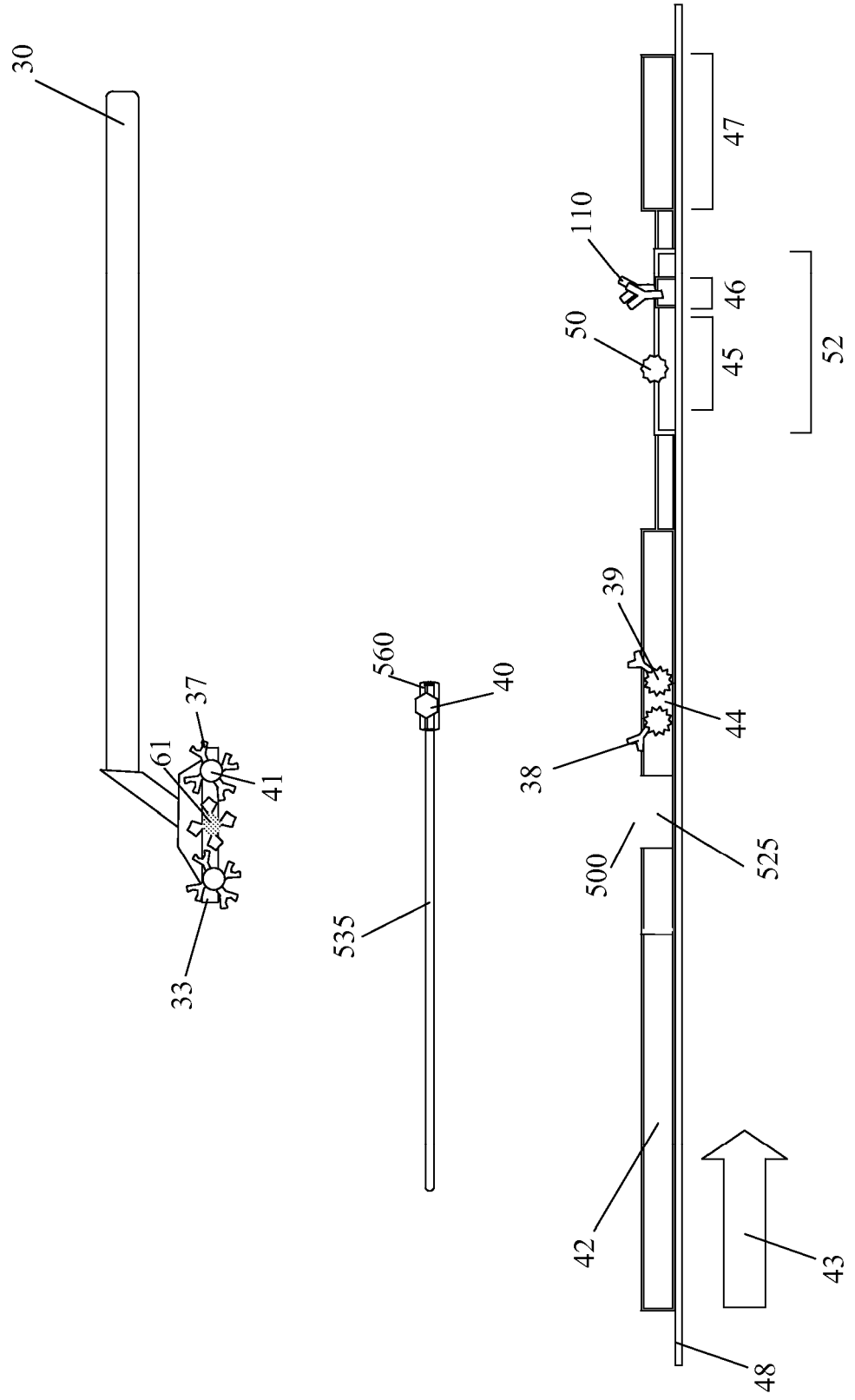


Fig. 25B

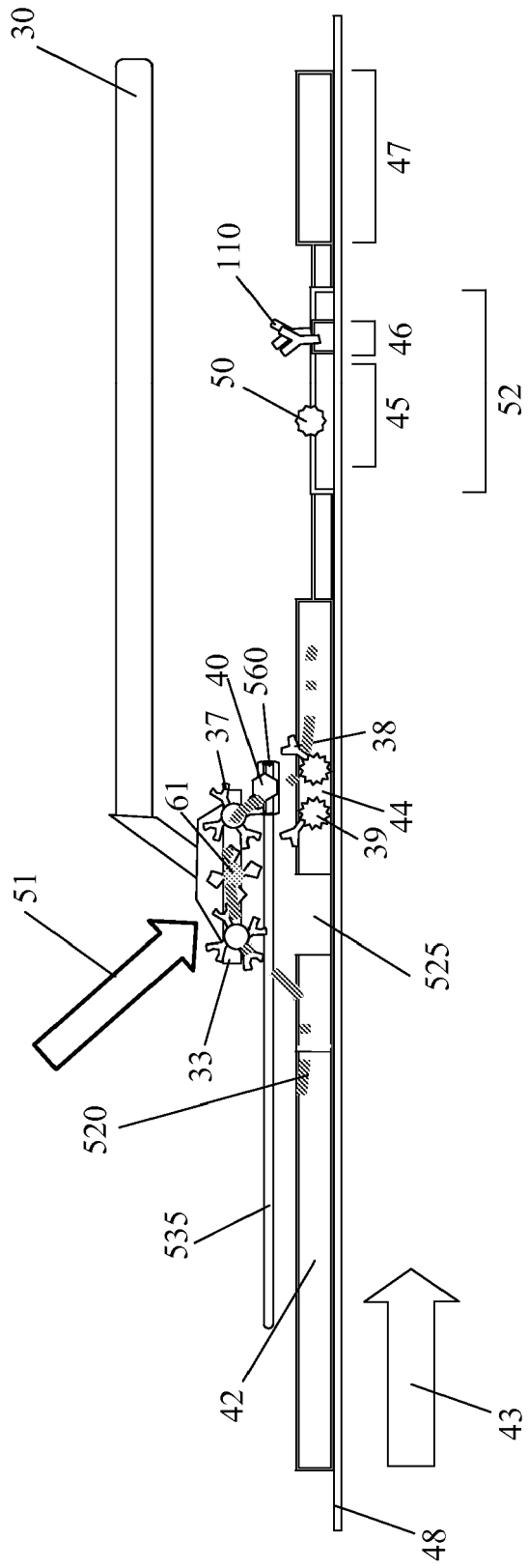


Fig. 26A

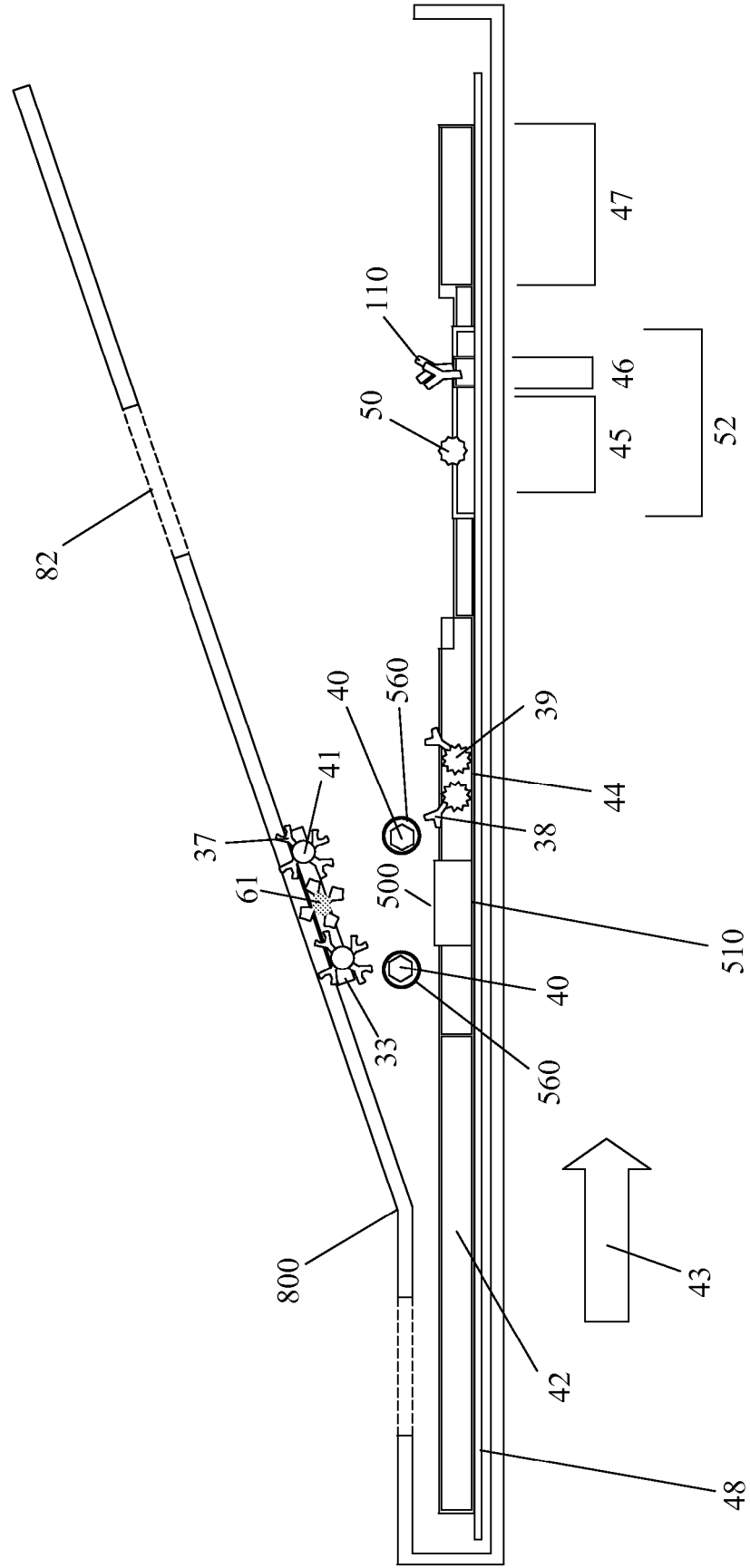
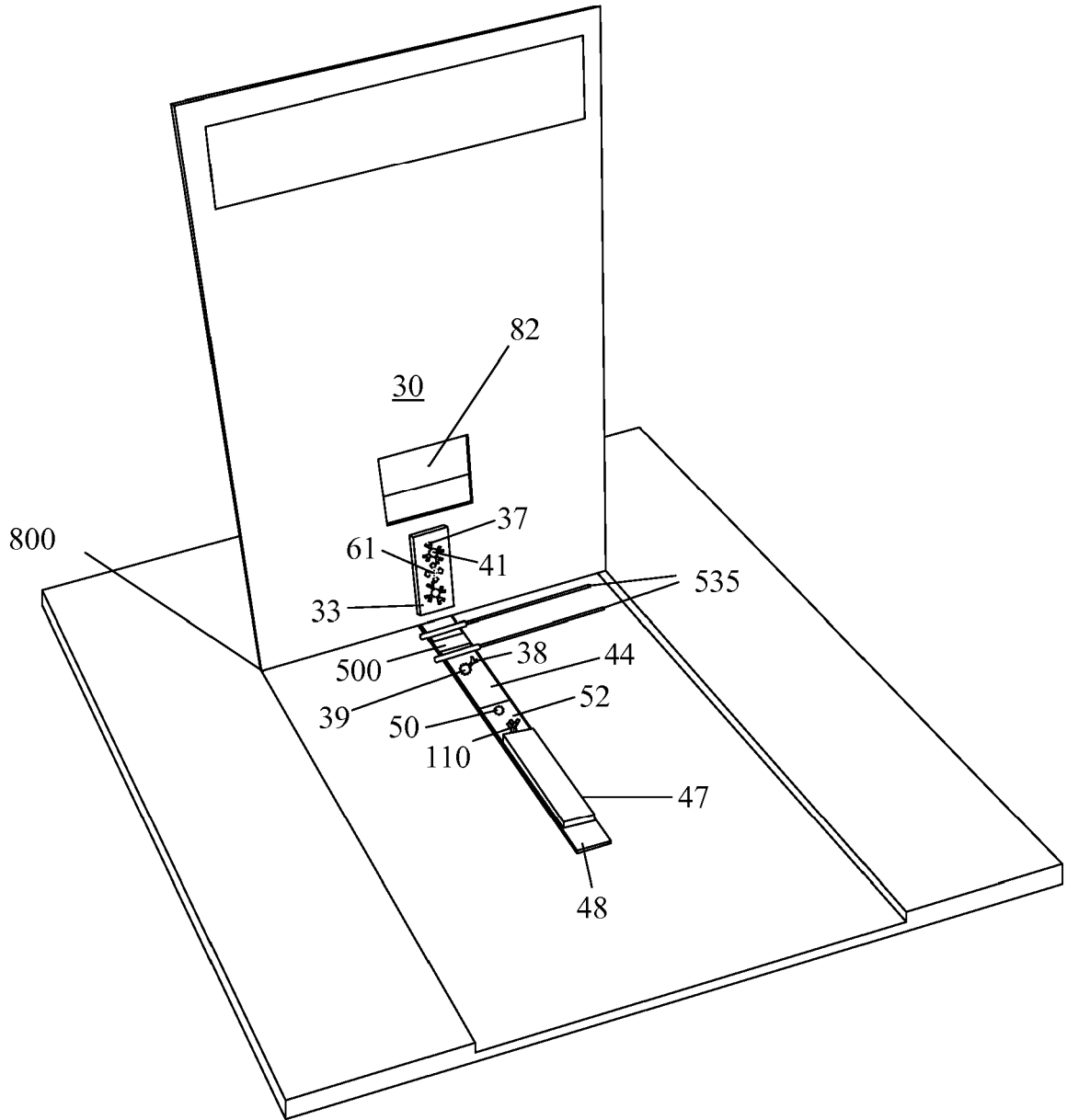


Fig. 26B



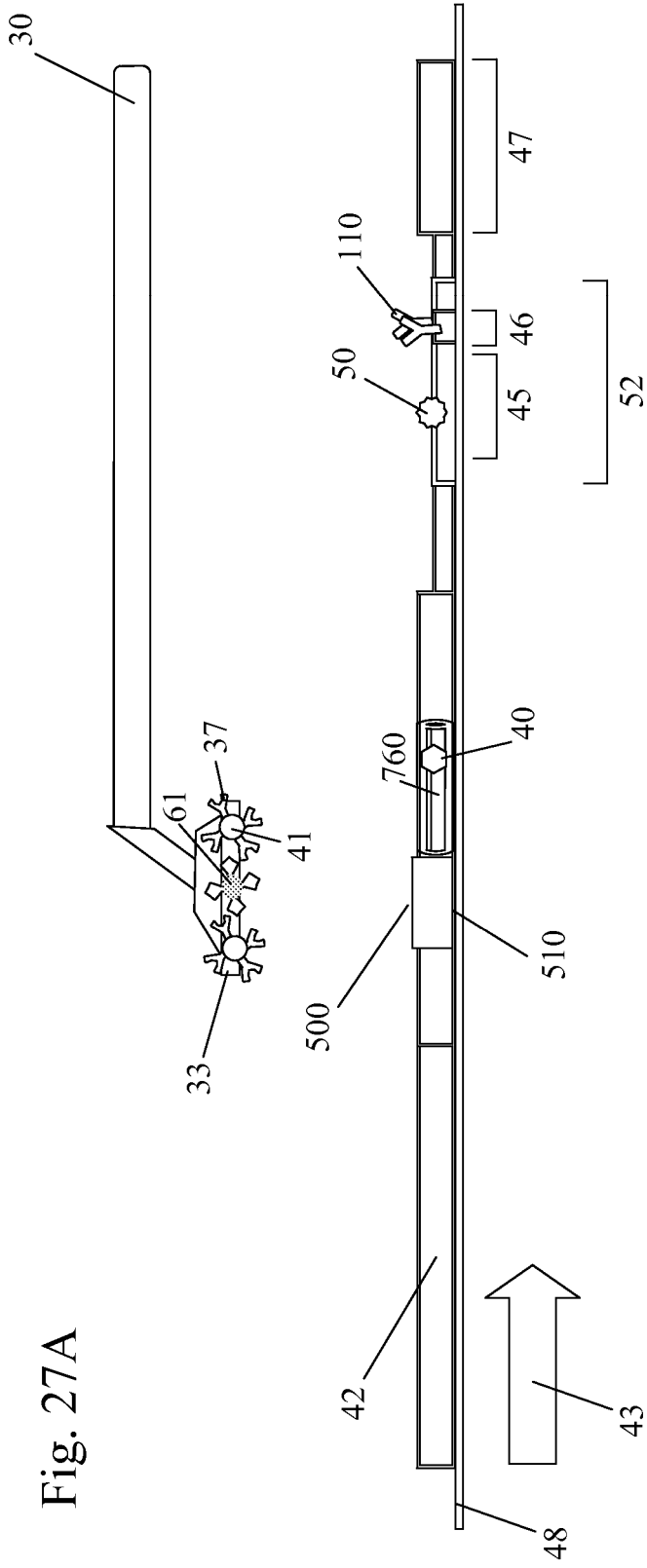


Fig. 27A

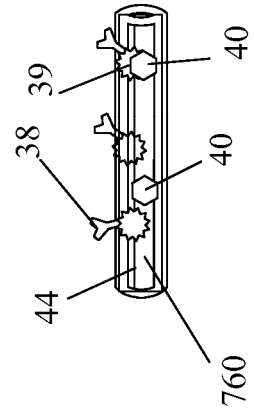


Fig. 27C

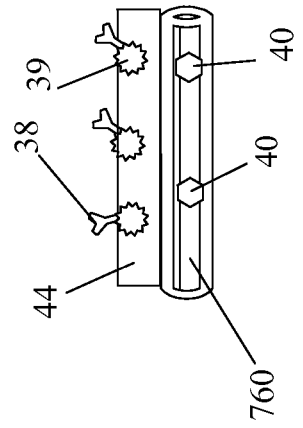


Fig. 27B

Fig. 28

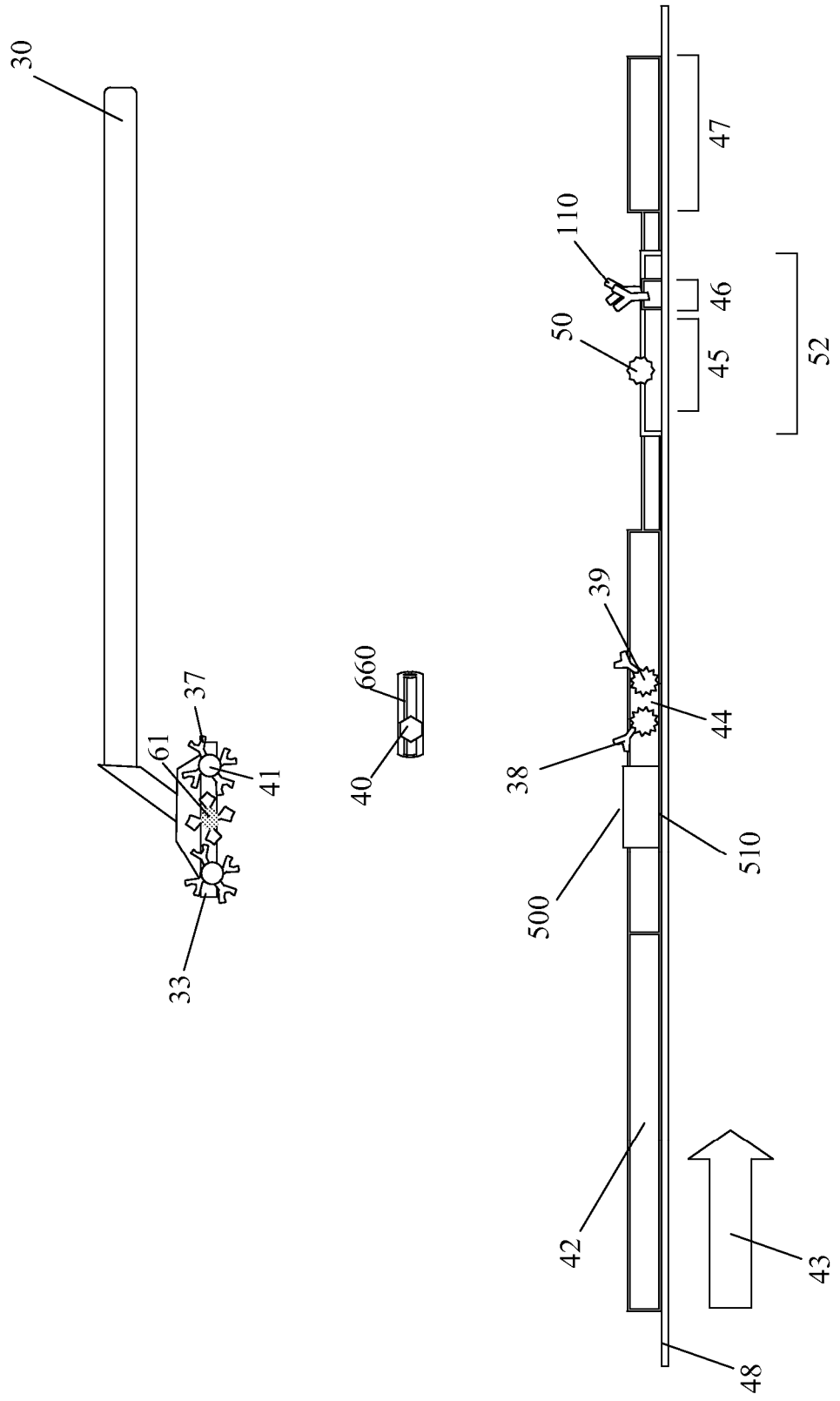


Fig. 29A

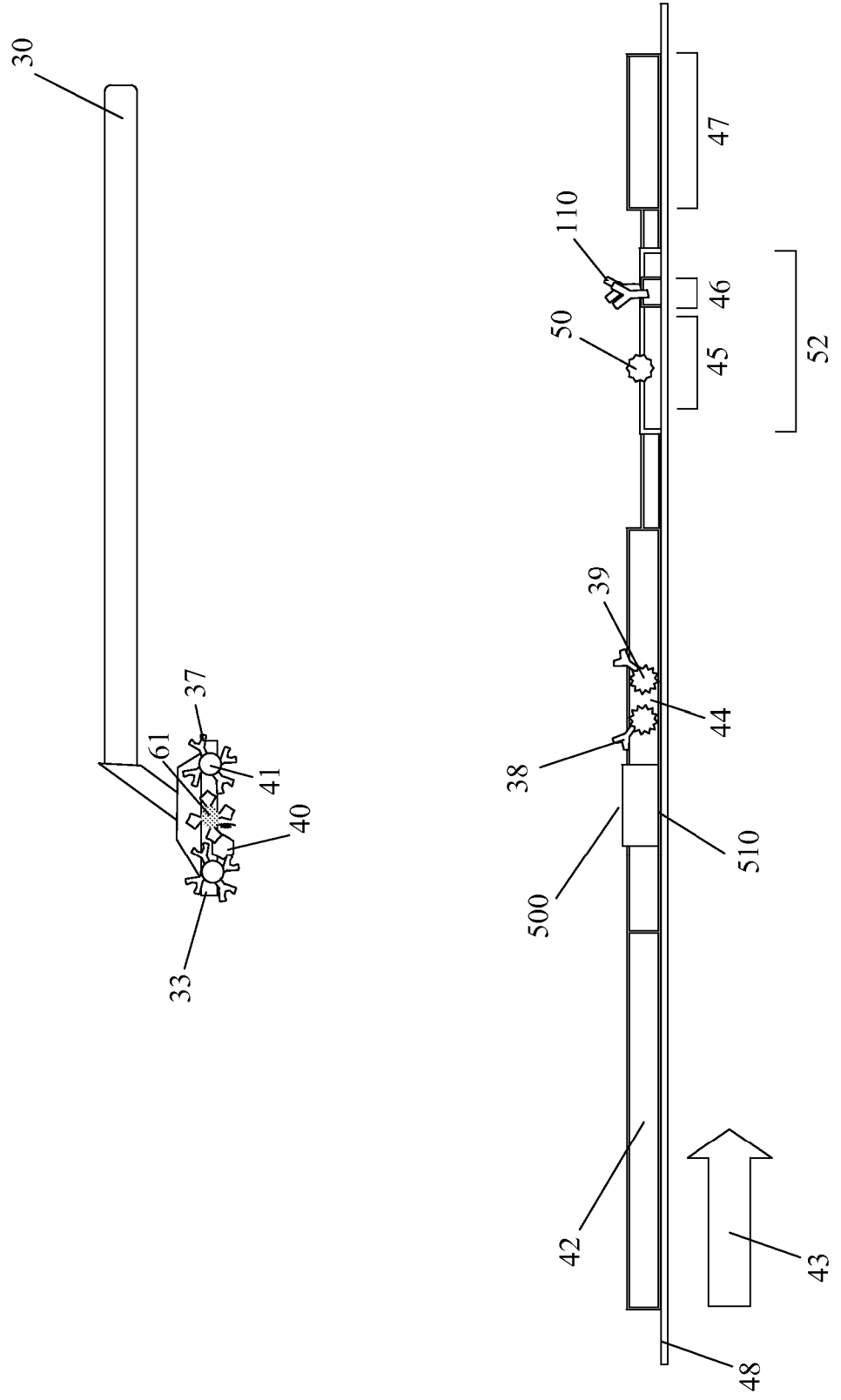


Fig. 29B

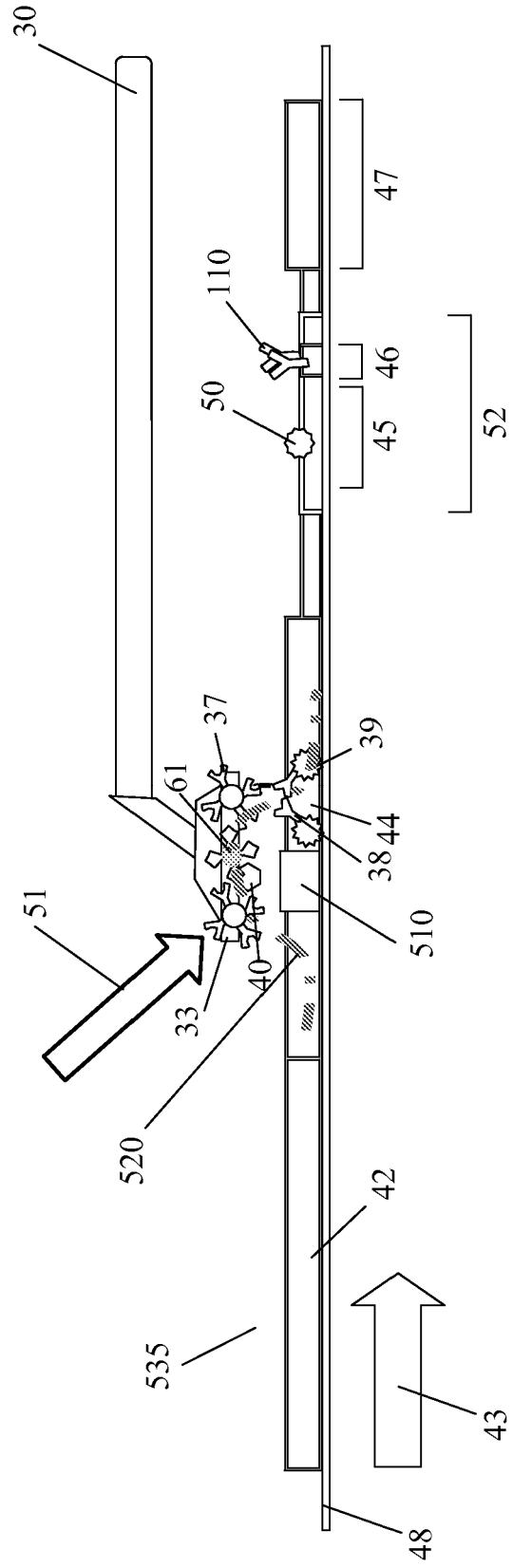


Fig. 30A

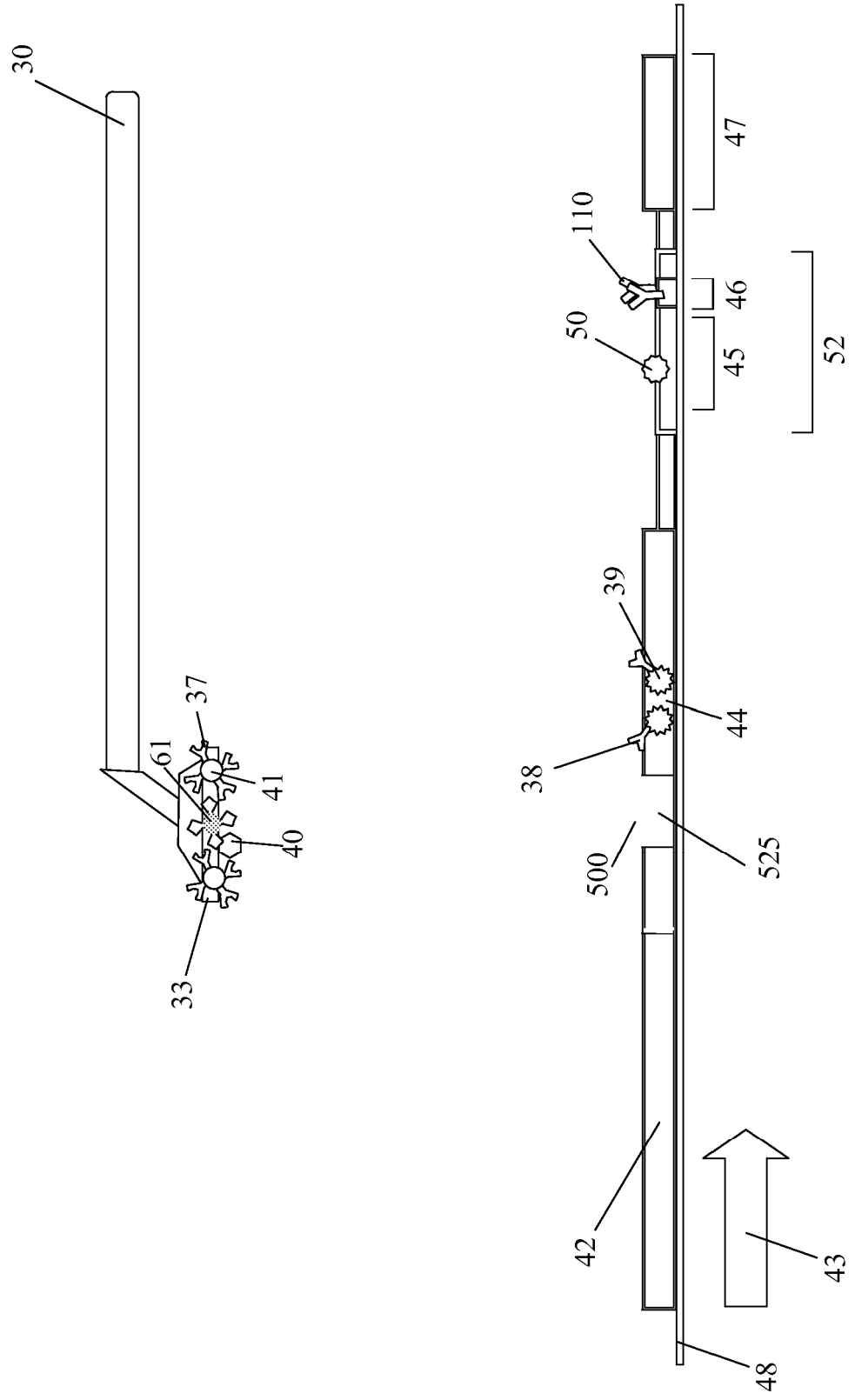


Fig. 30B

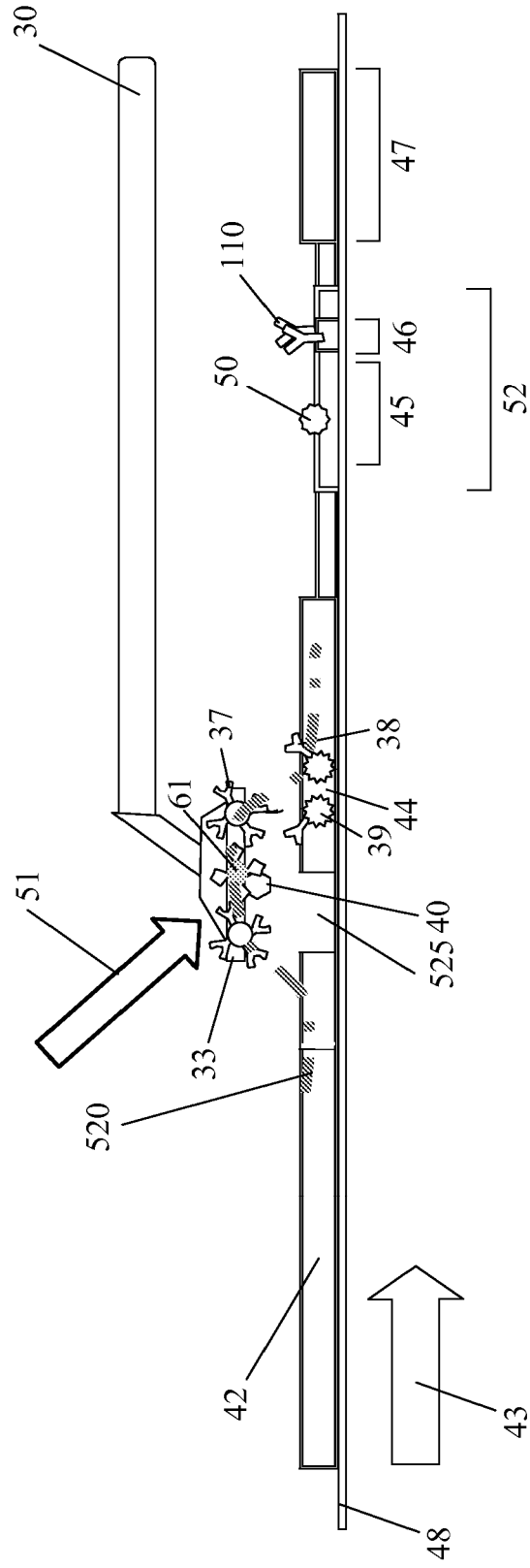


Fig. 31A

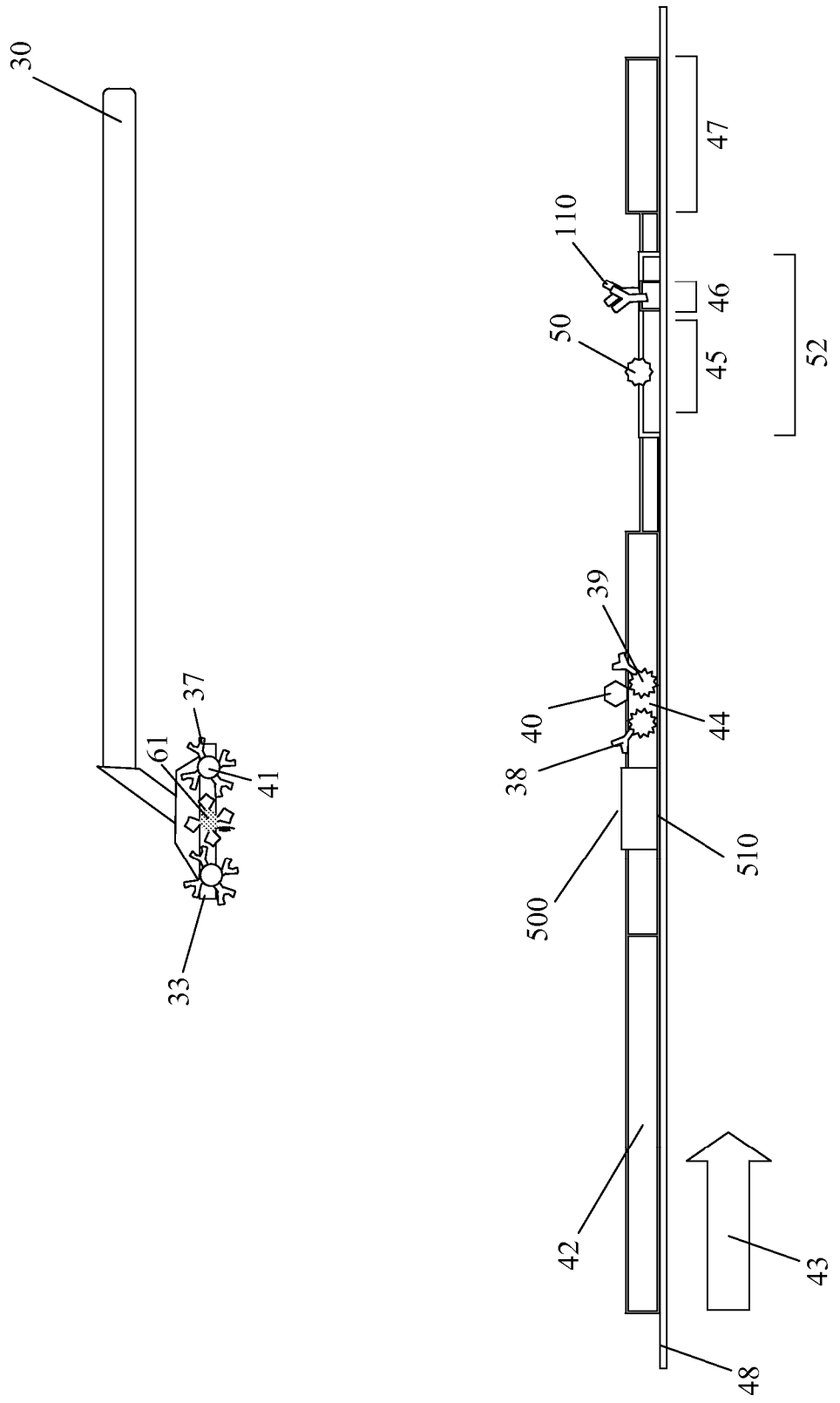


Fig. 31B

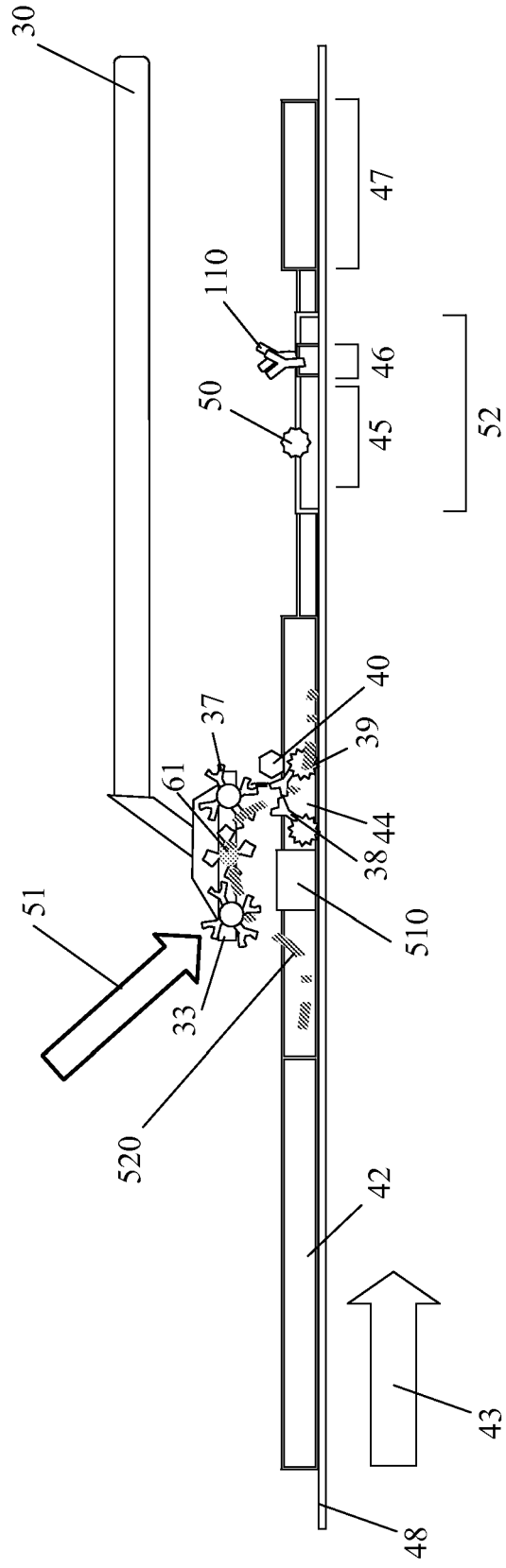


Fig. 32A

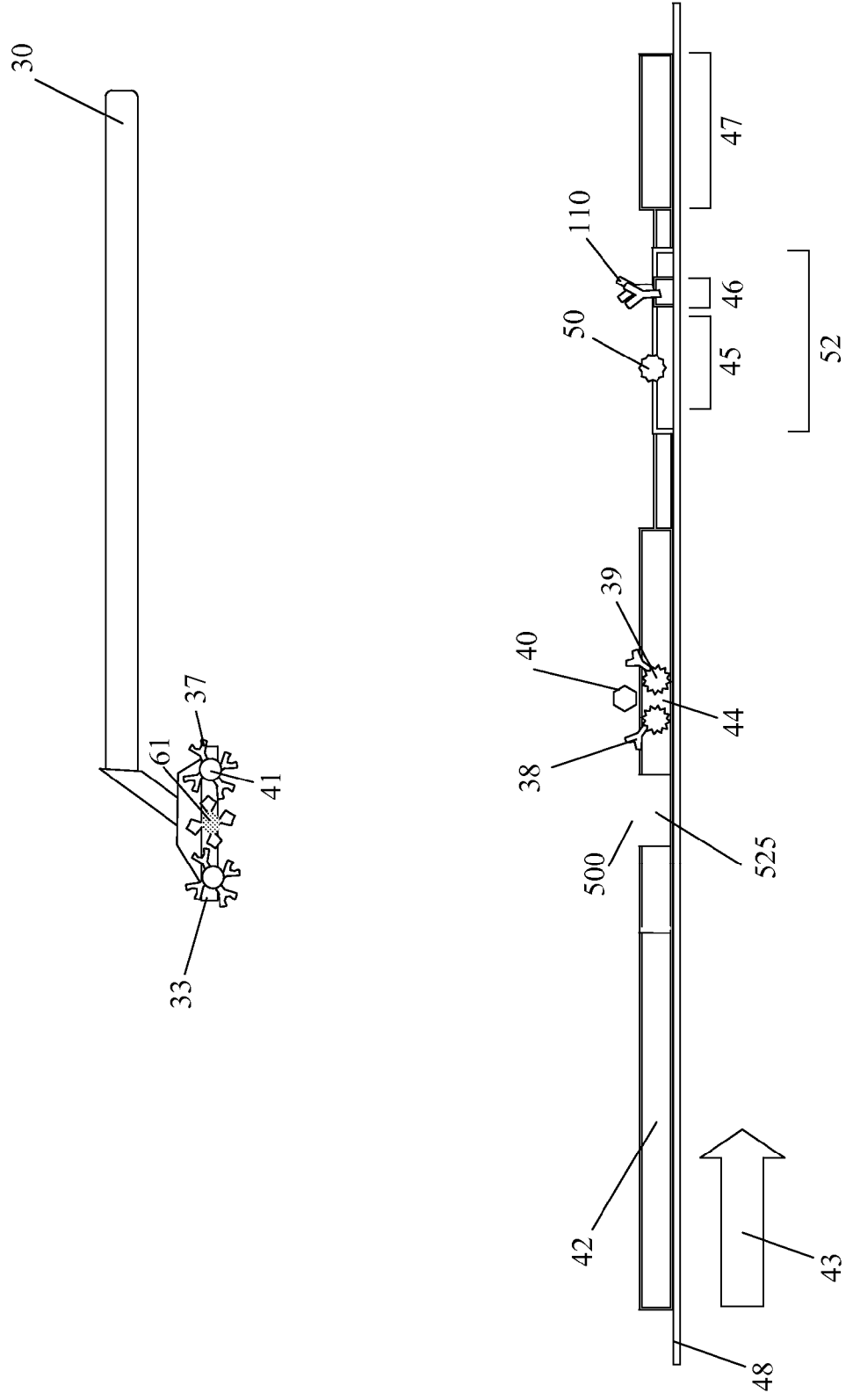


Fig. 32B

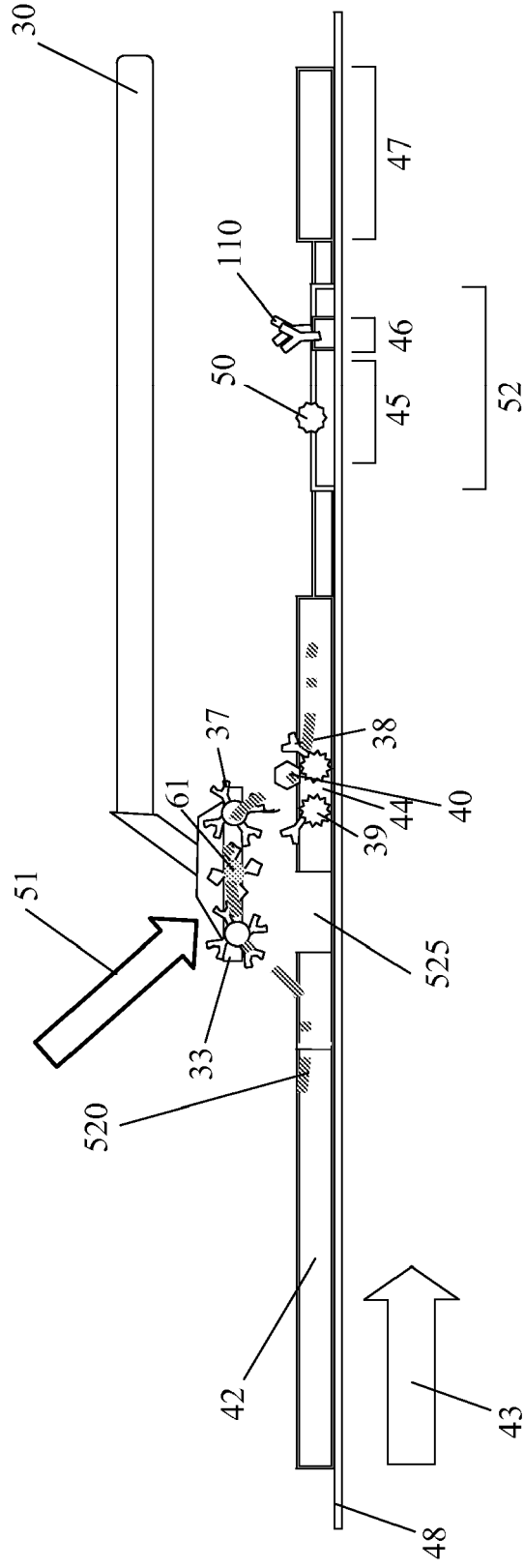


Fig. 33A

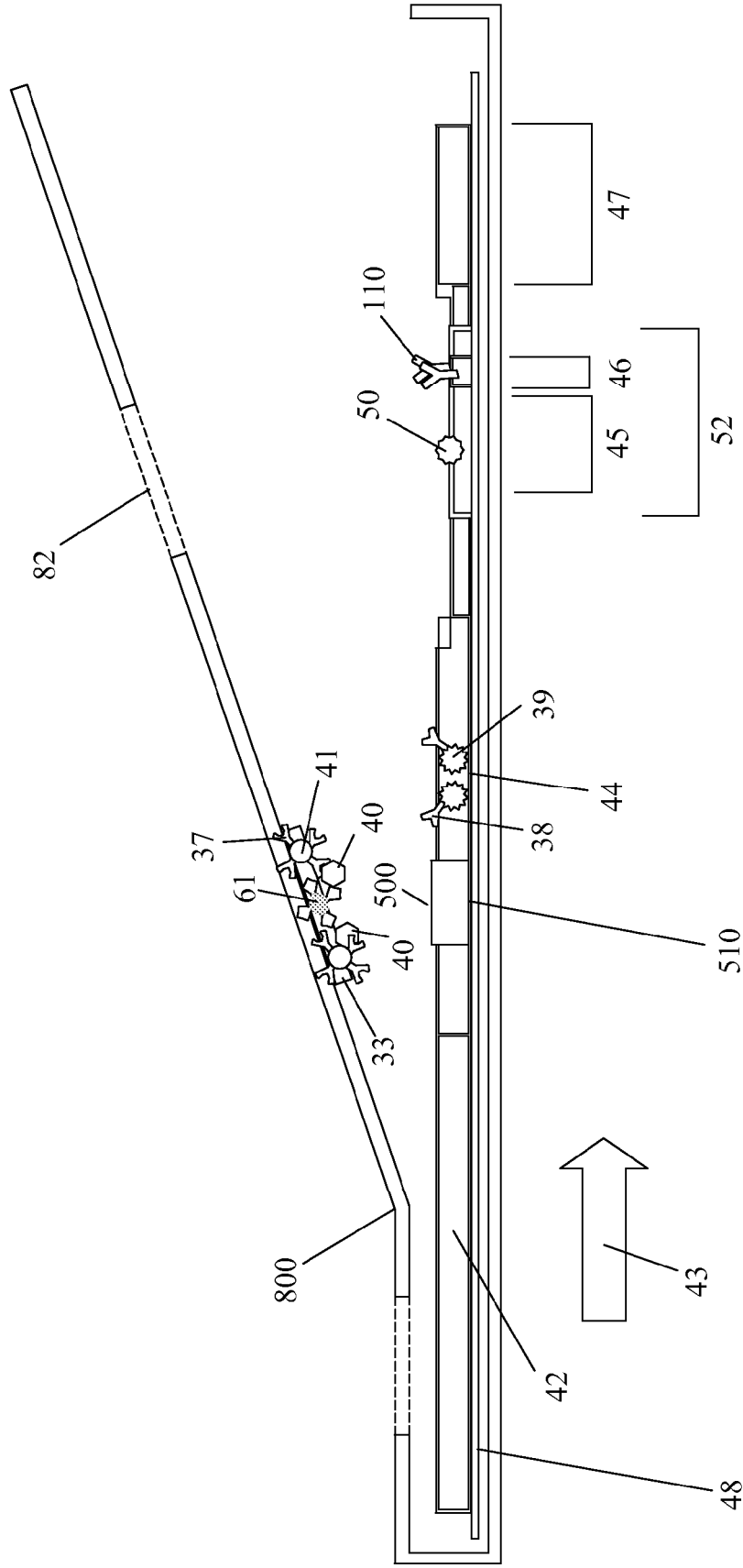


Fig. 33B

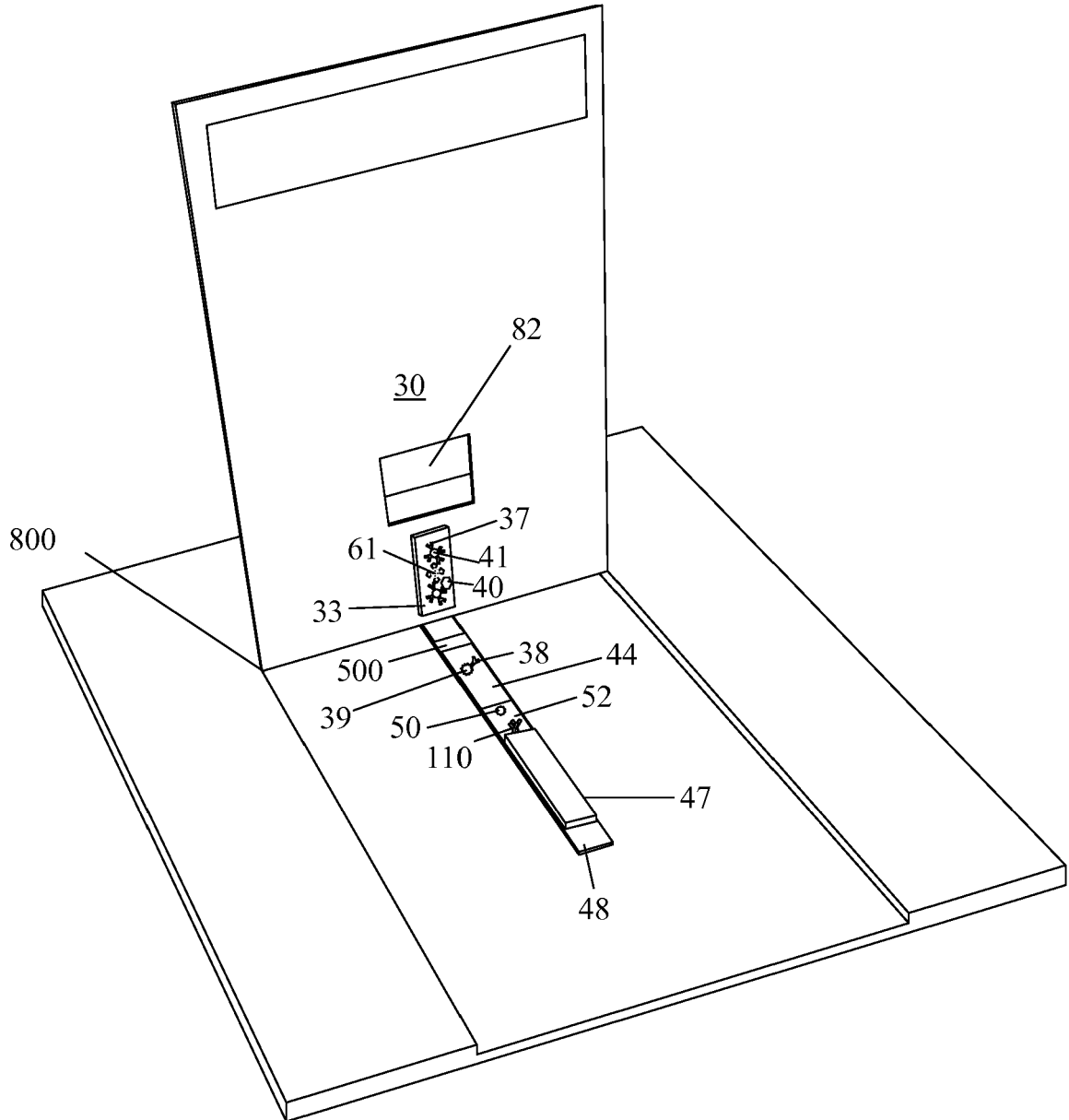


Fig. 34A

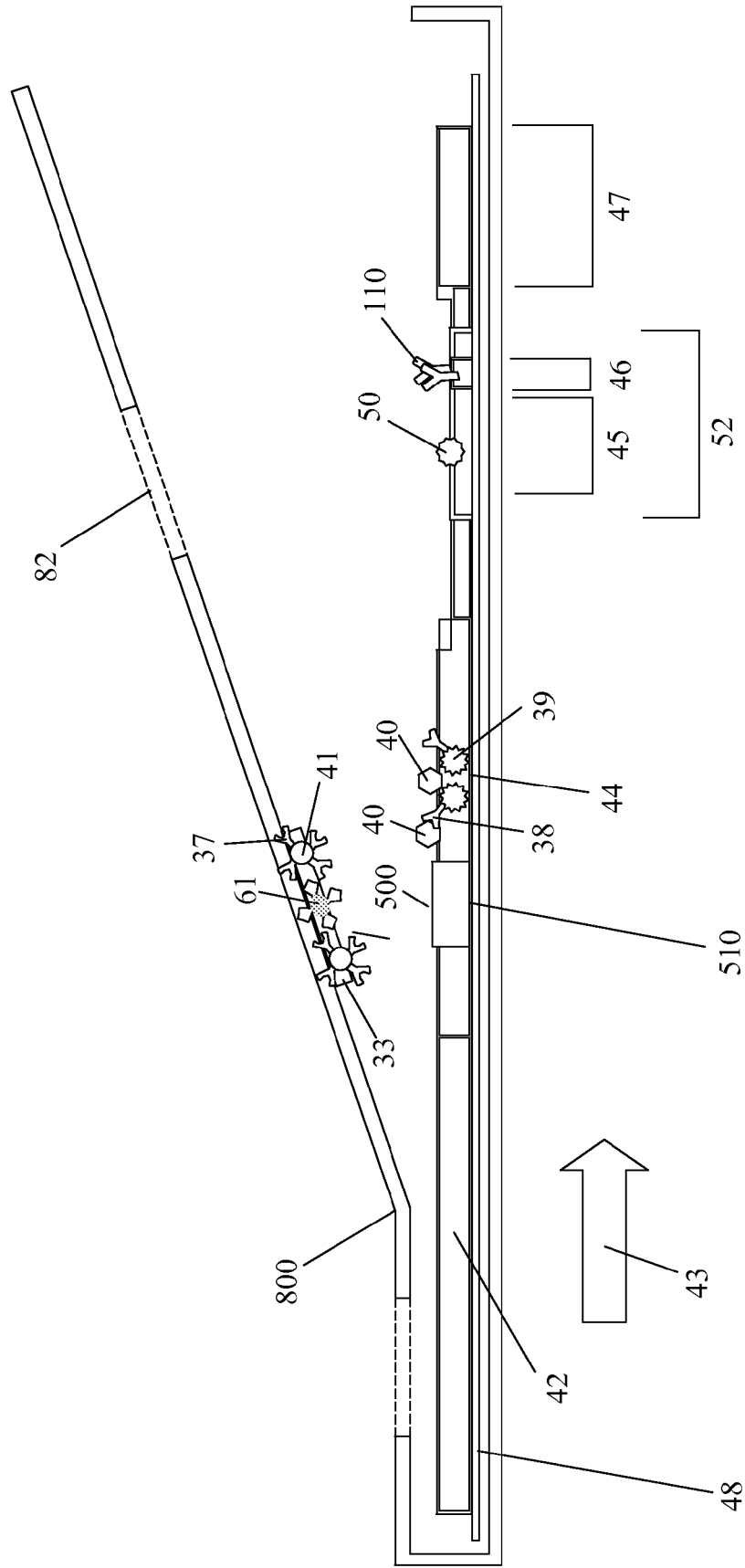


Fig. 34B

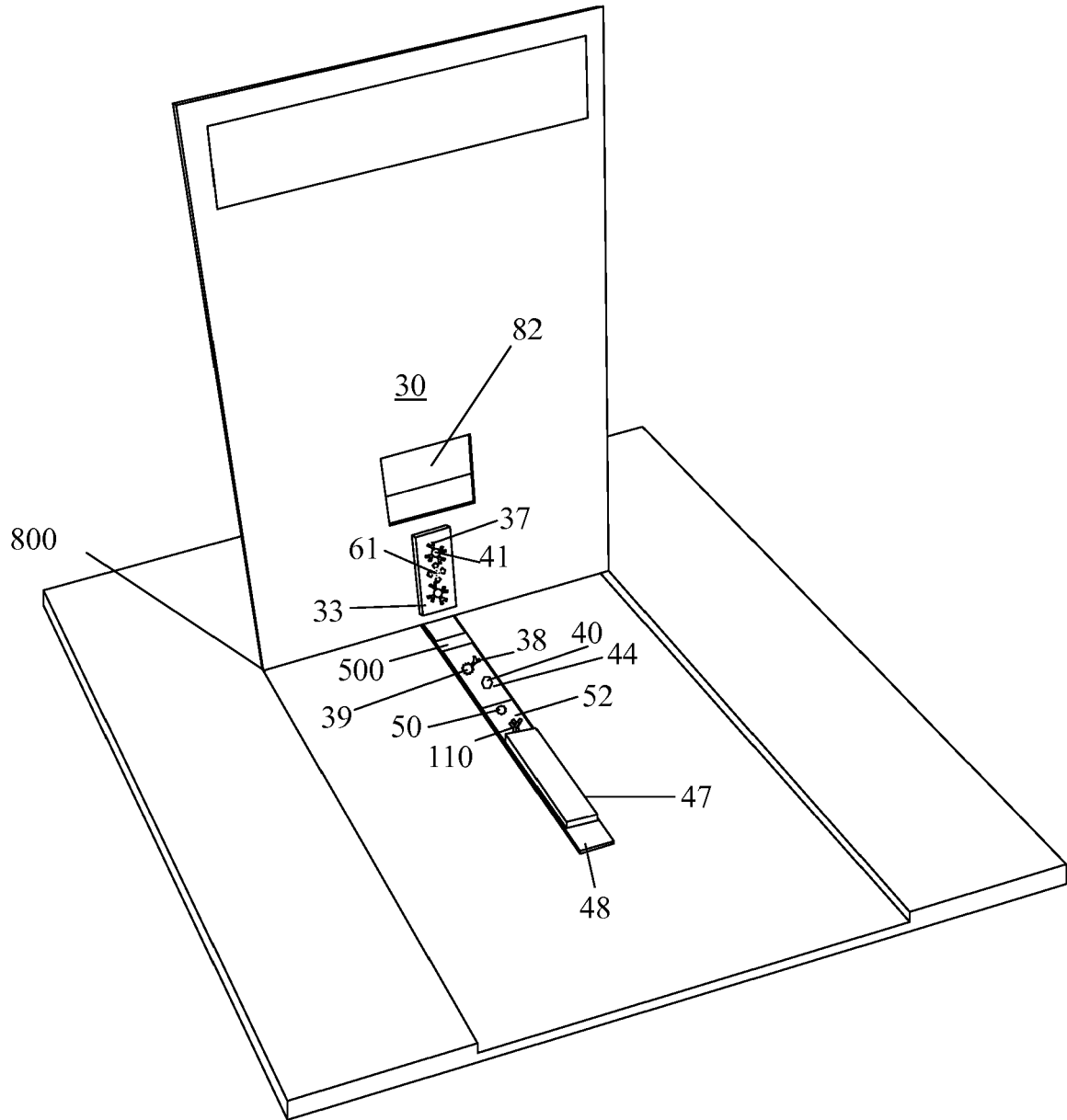


Fig. 35A

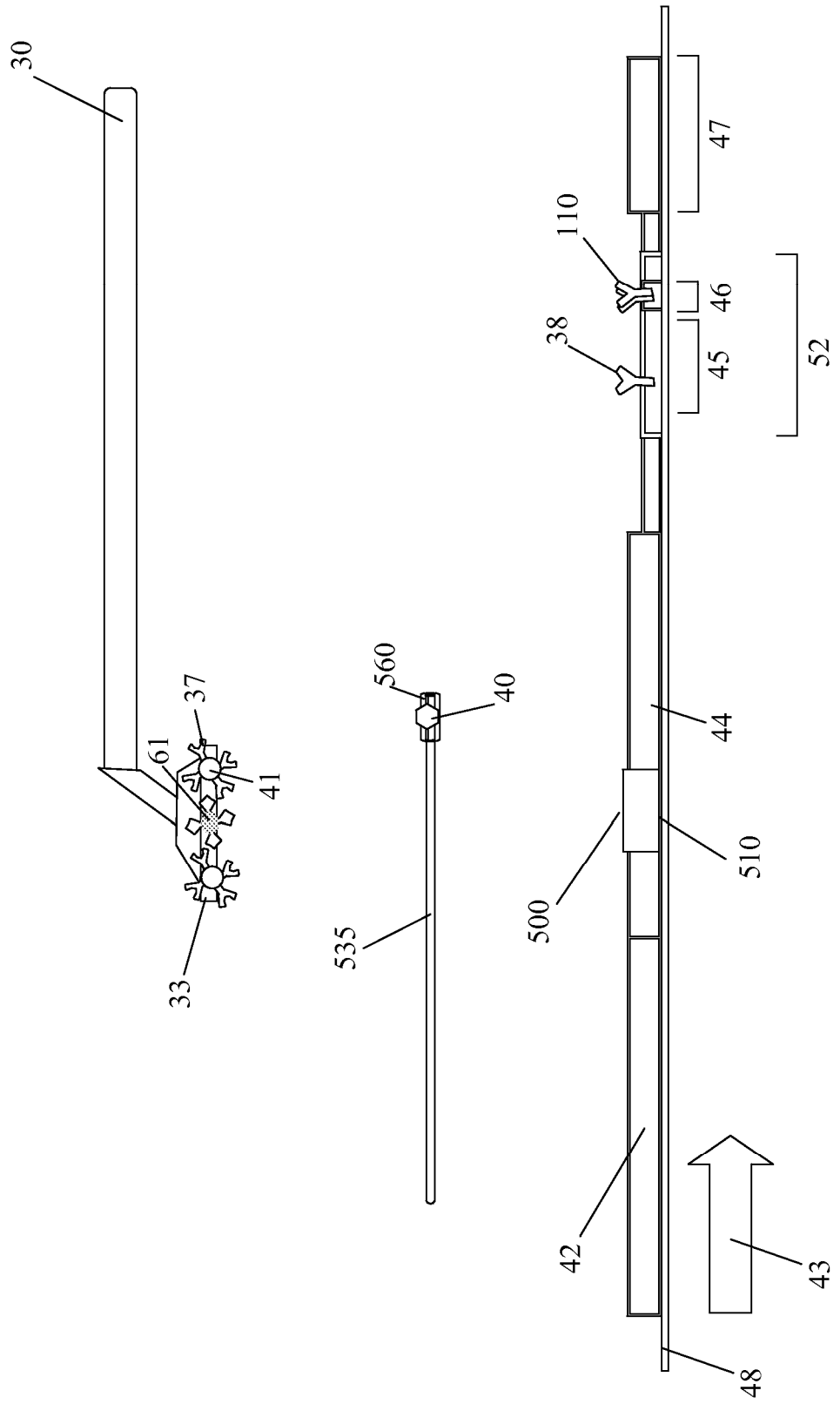


Fig. 35B

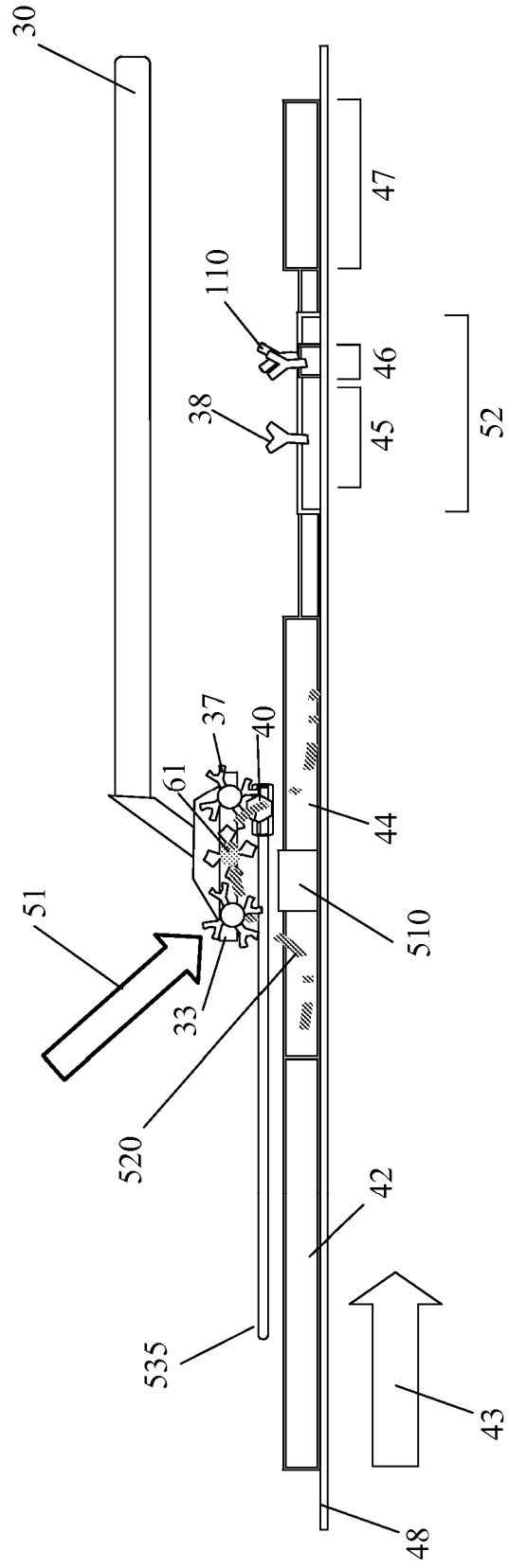


Fig. 36A

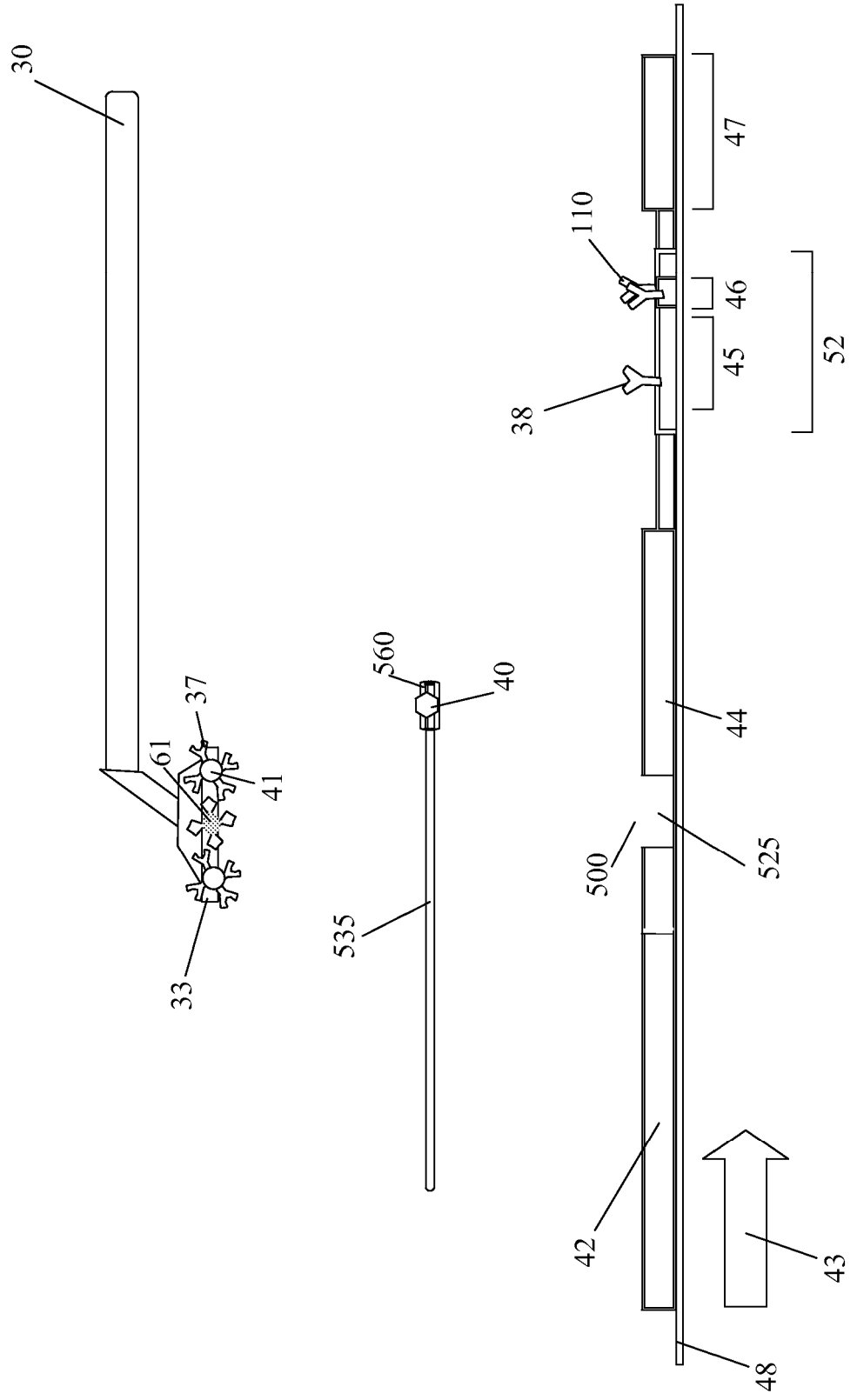


Fig. 36B

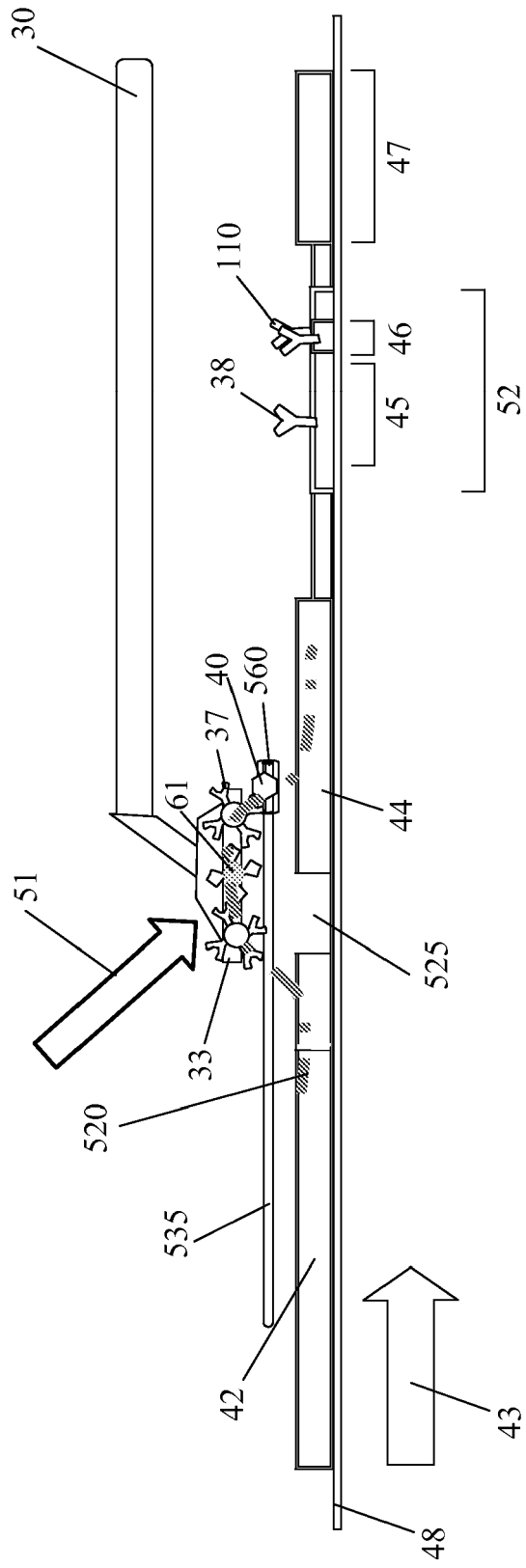


Fig. 37A

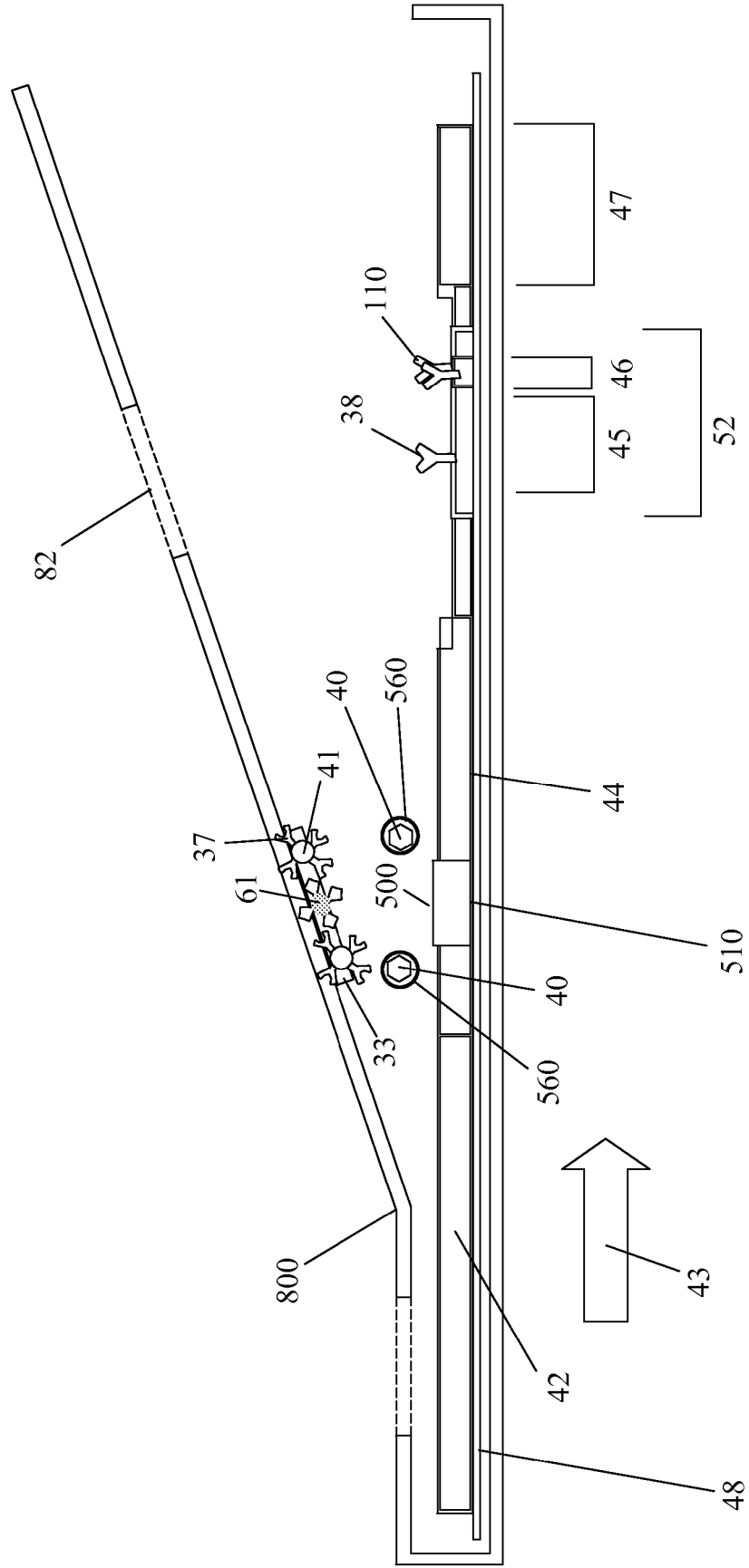
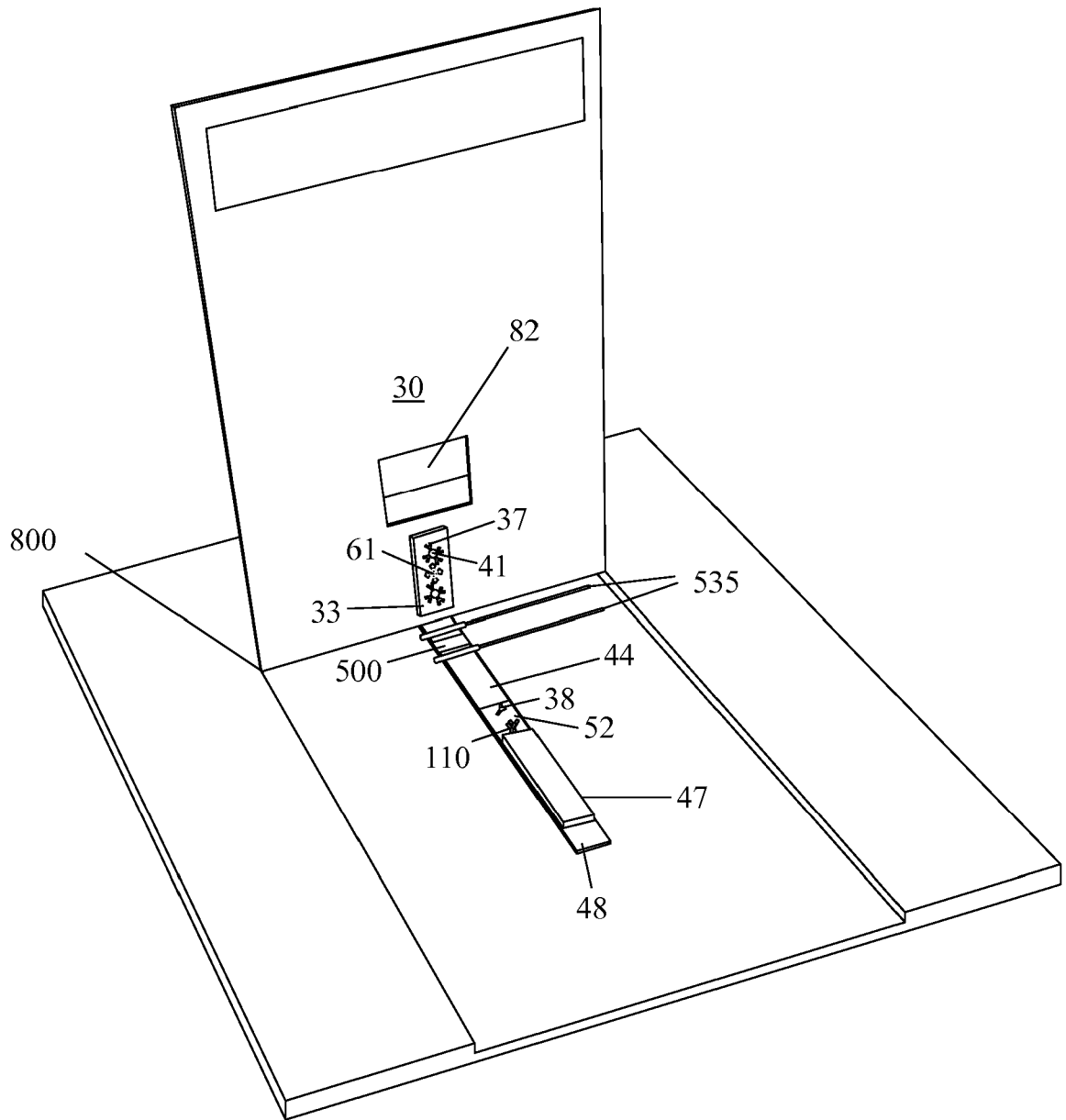


Fig. 37B



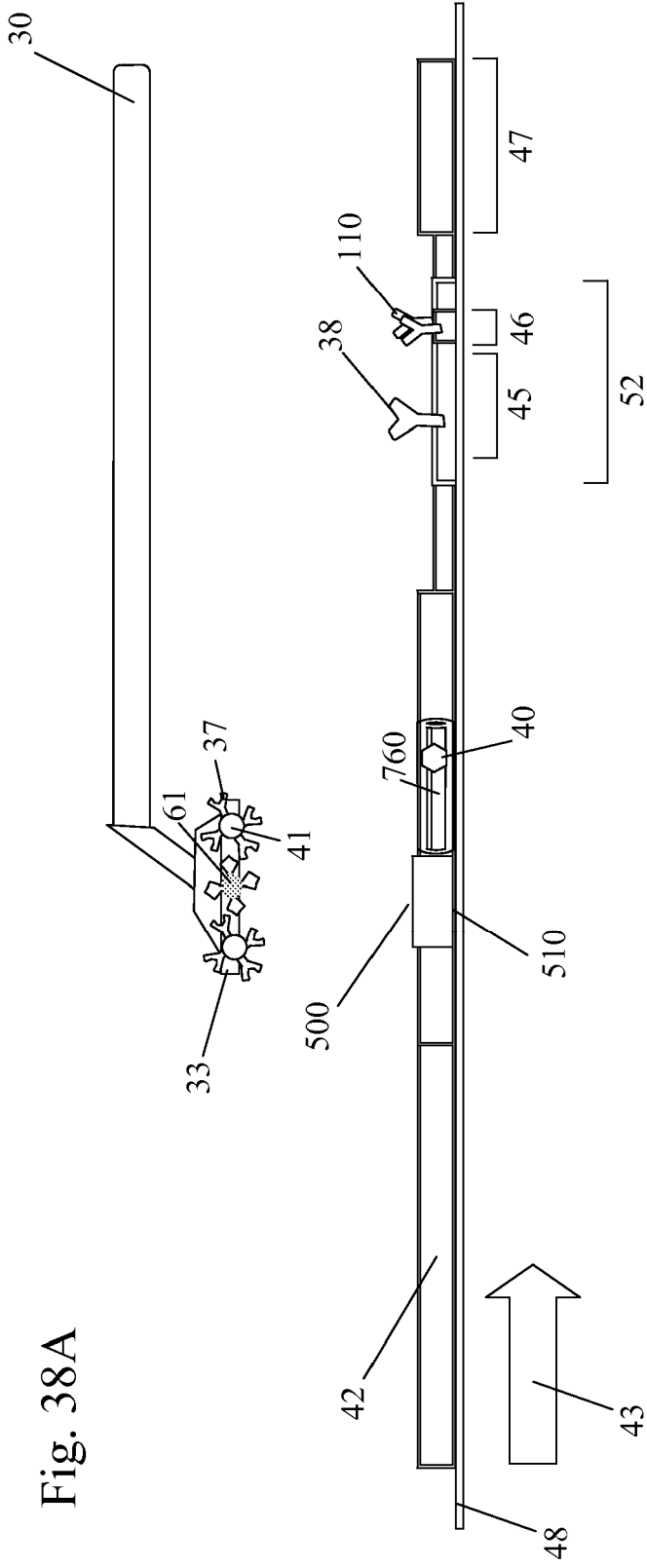


Fig. 38A

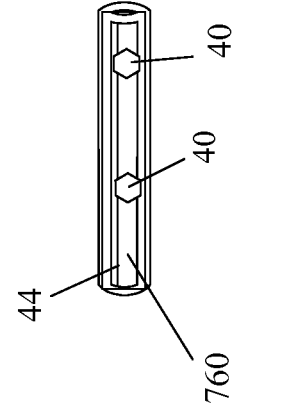


Fig. 38B

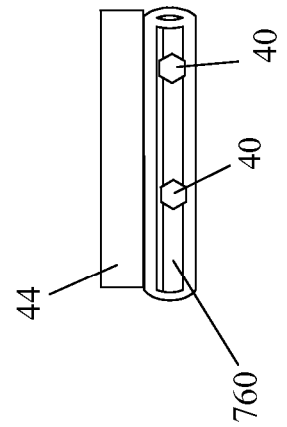


Fig. 38C

Fig. 39

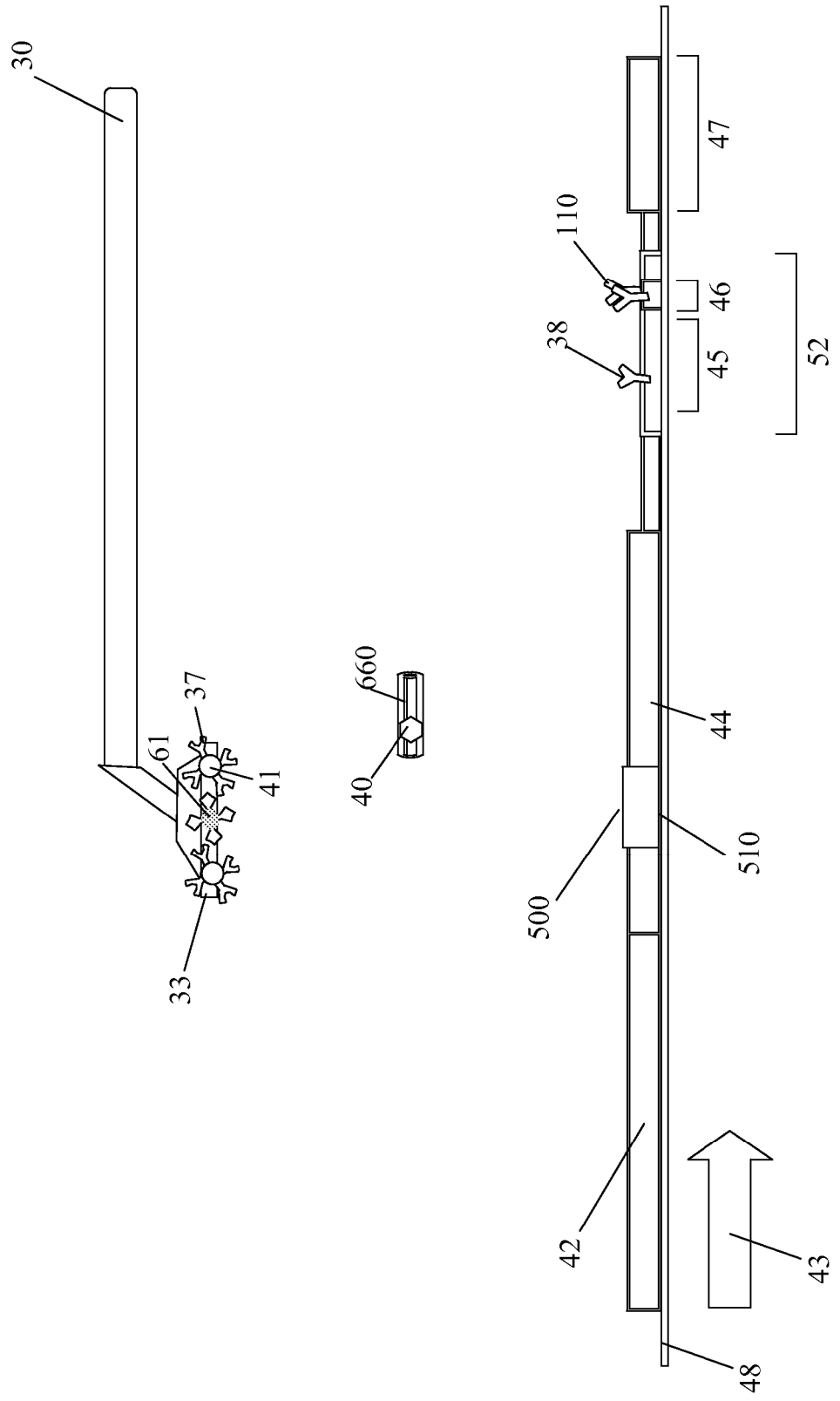


Fig. 40A

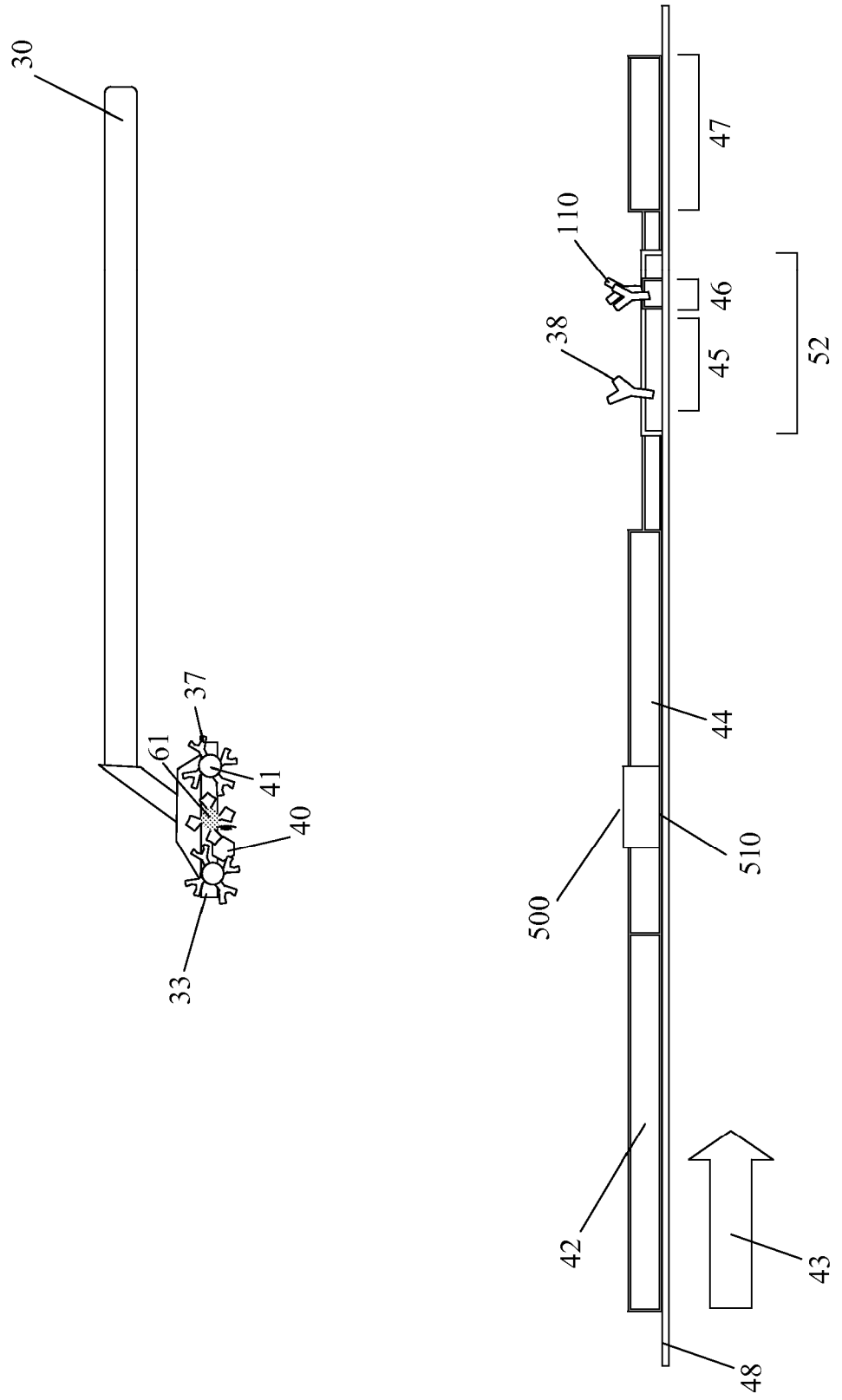


Fig. 40B

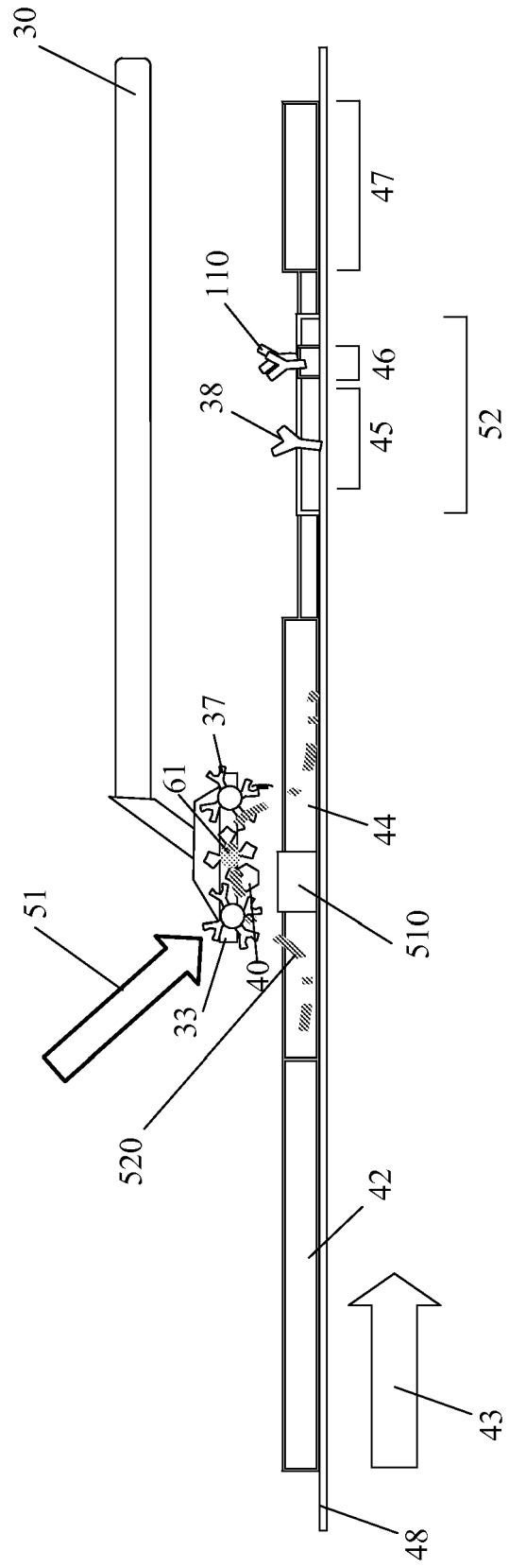


Fig. 41A

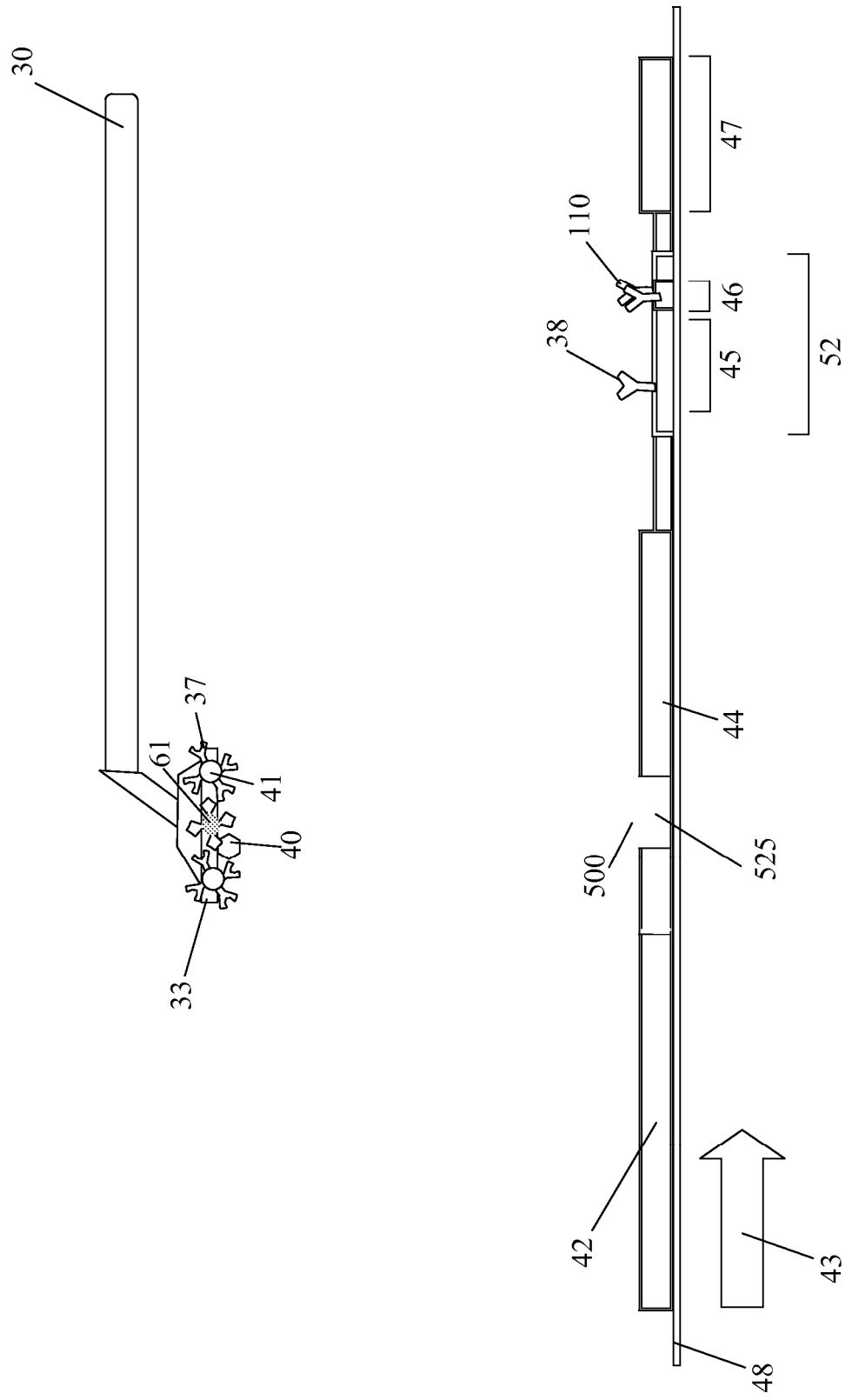


Fig. 41B

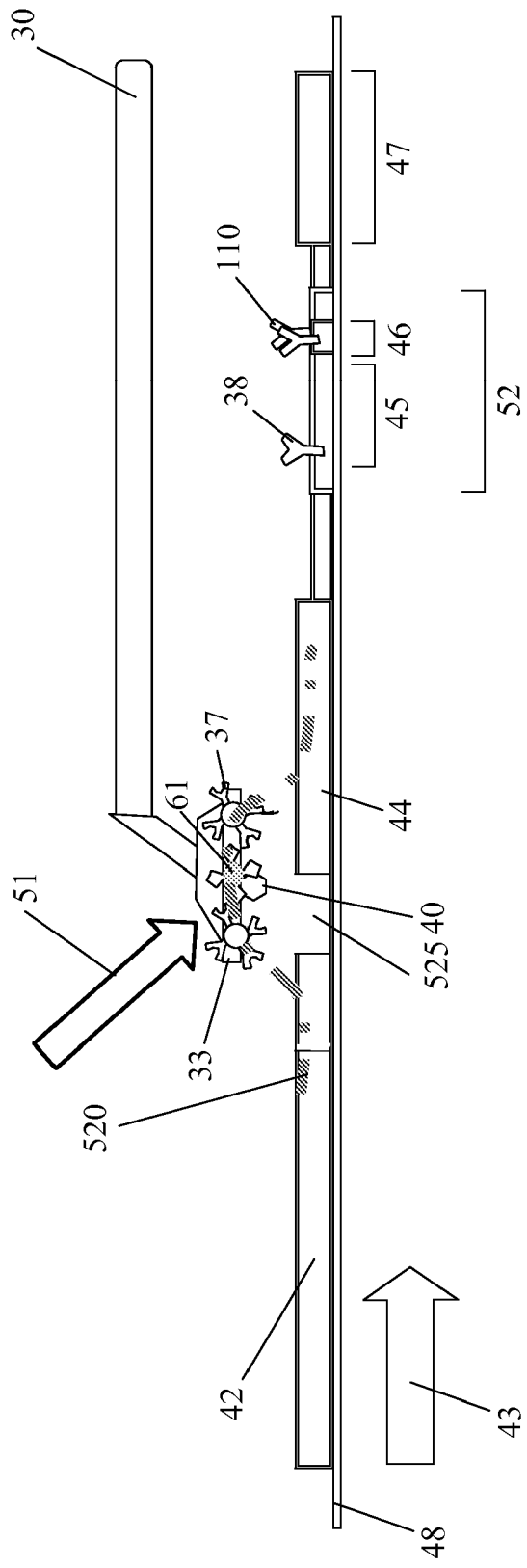


Fig. 42A

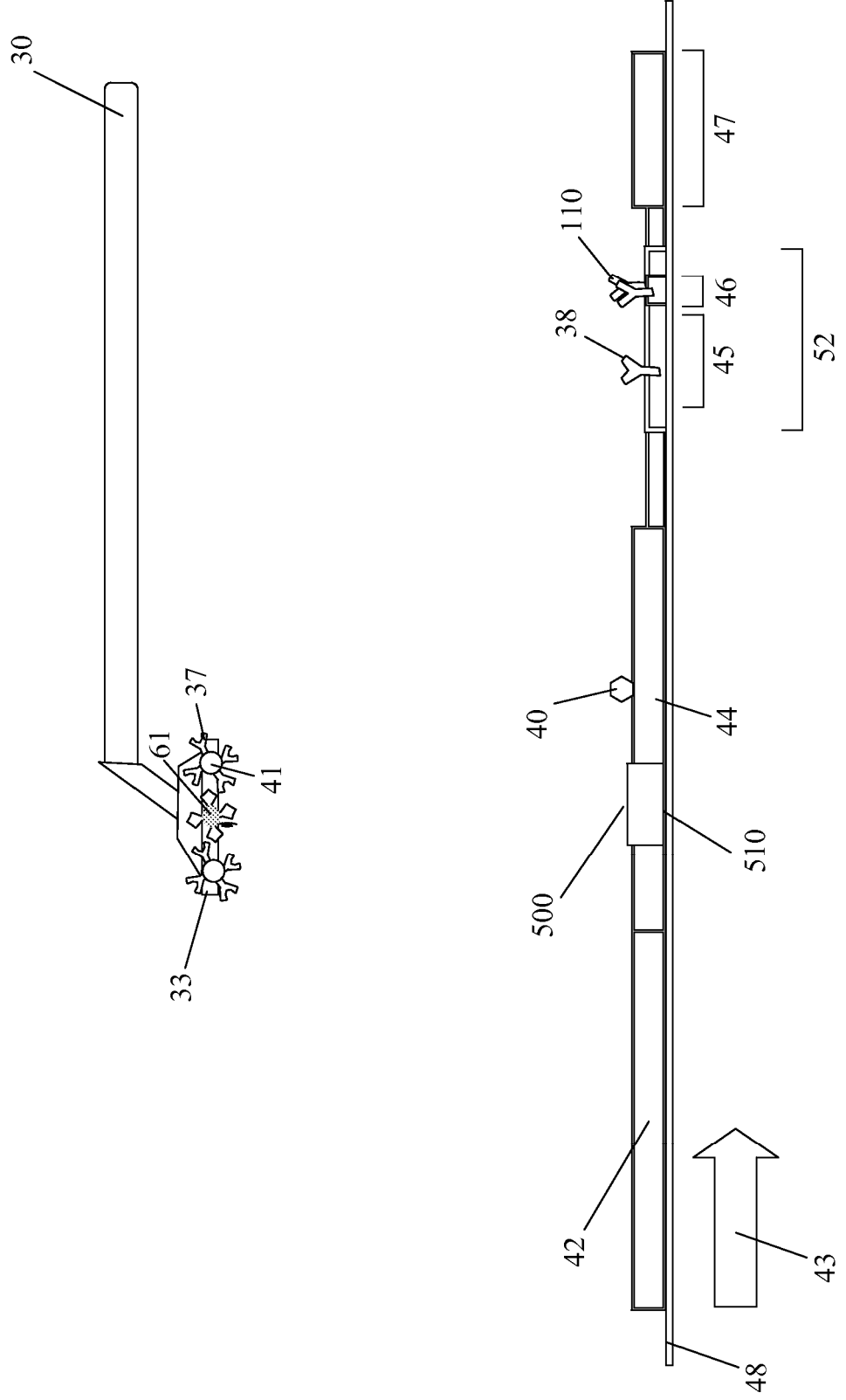


Fig. 42B

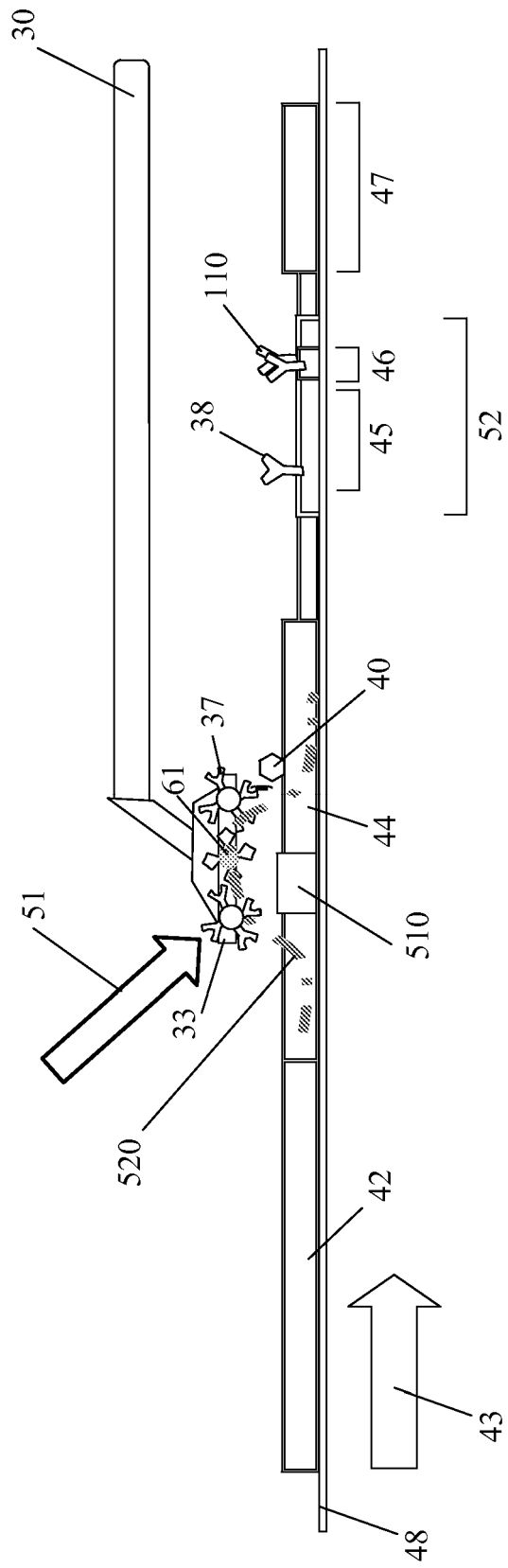


Fig. 43A

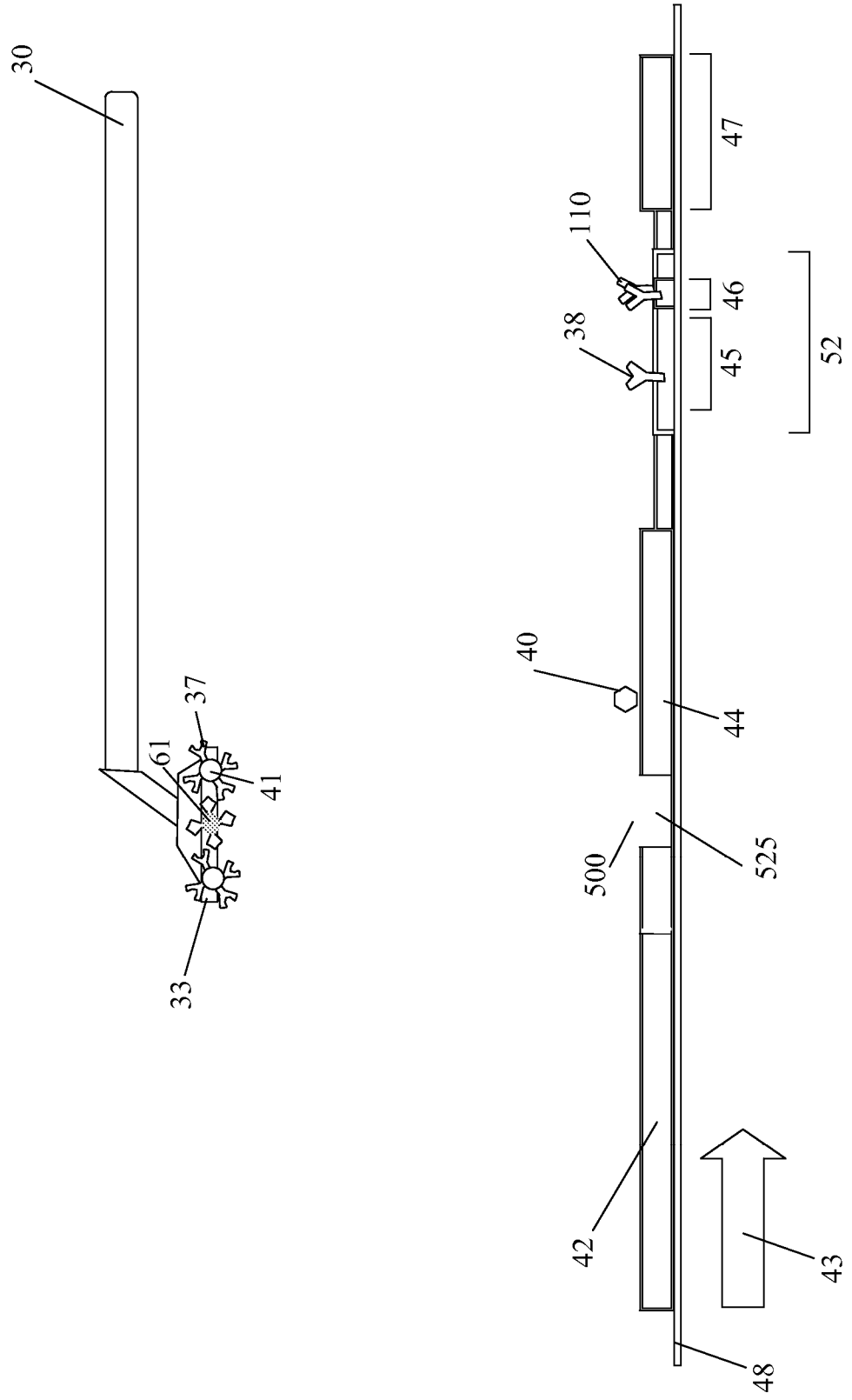


Fig. 43B

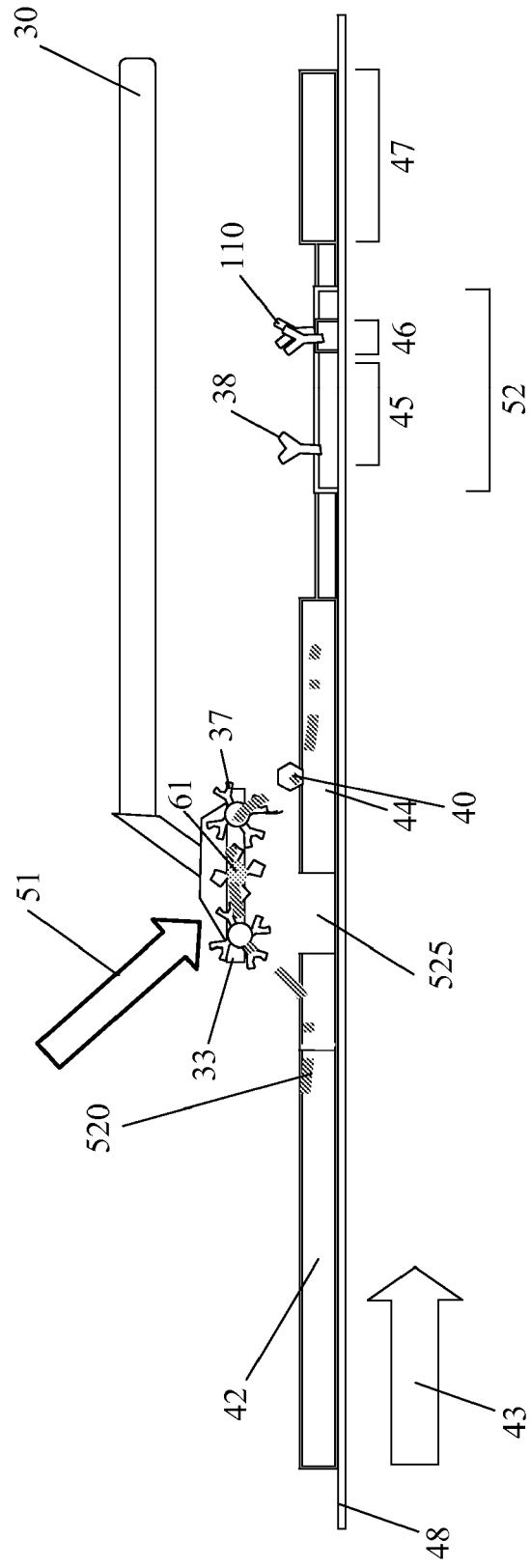


Fig. 44A

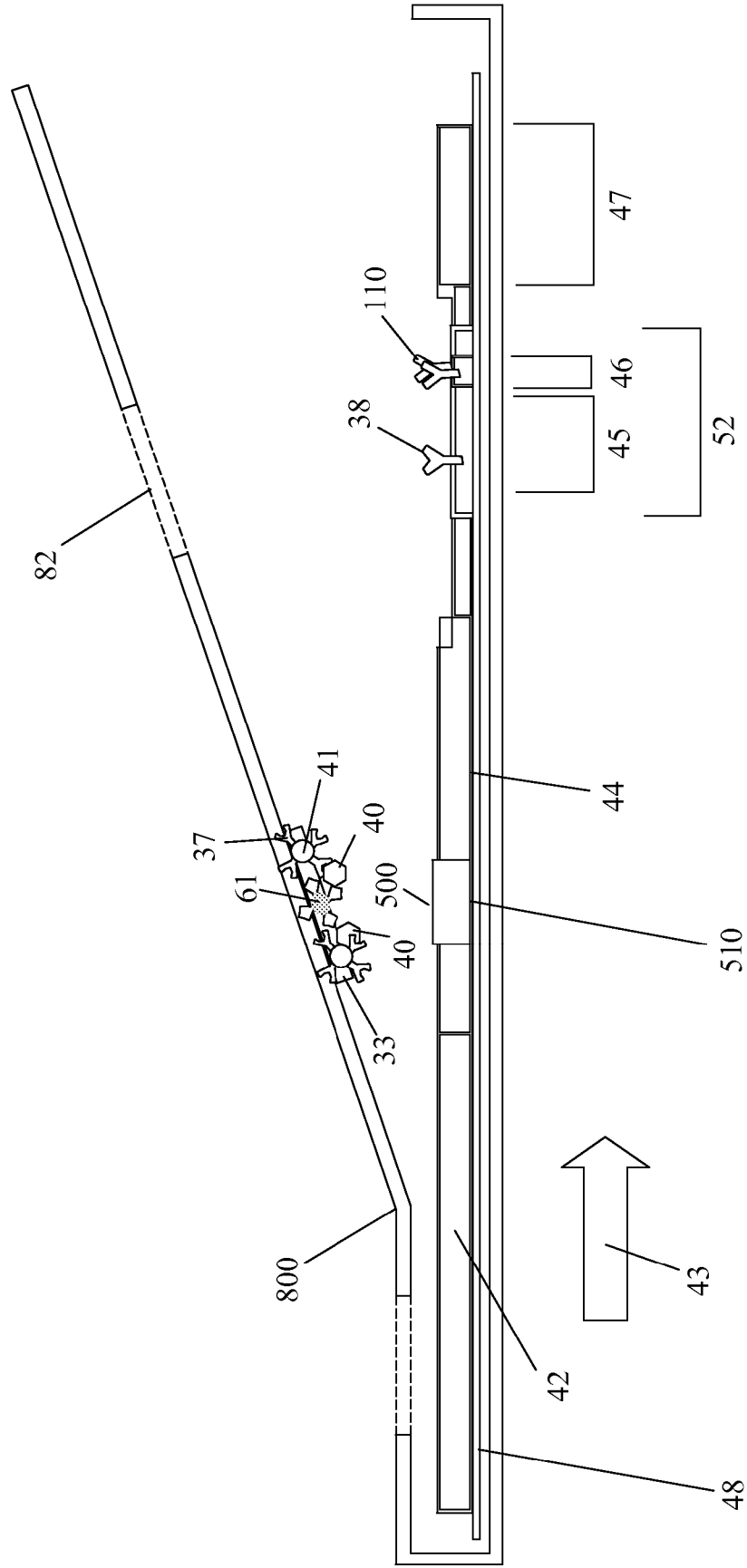


Fig. 44B

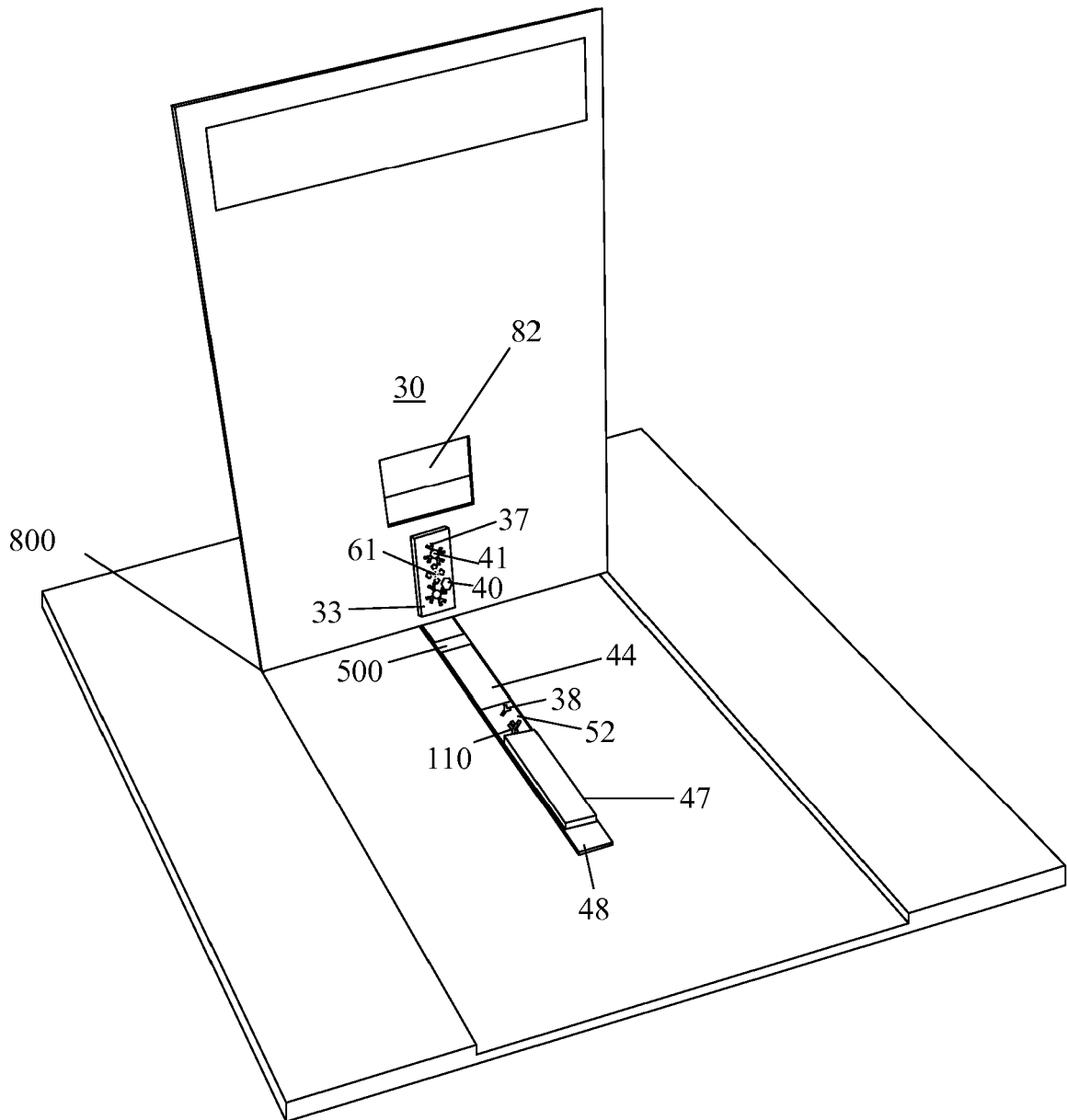


Fig. 45A

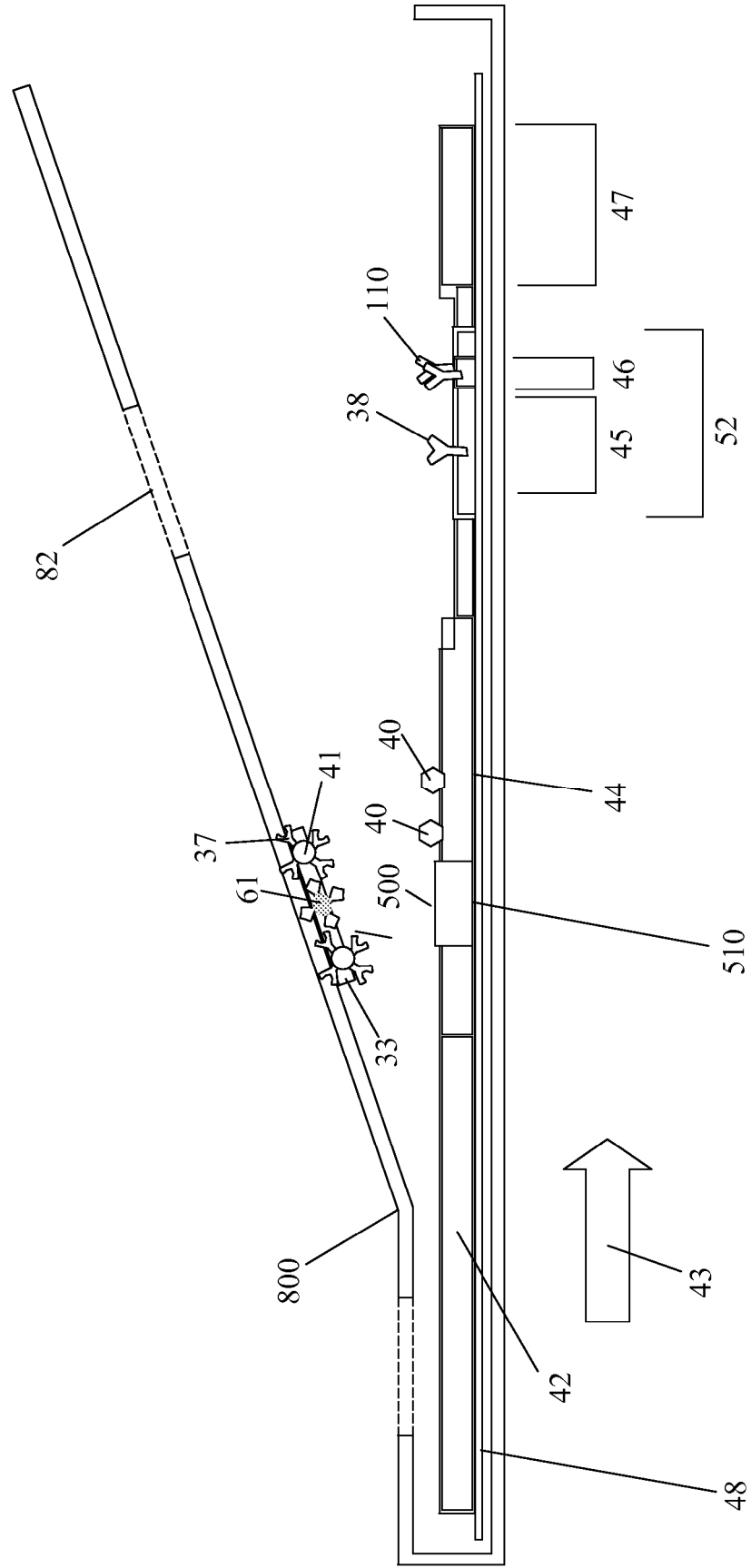


Fig. 45B

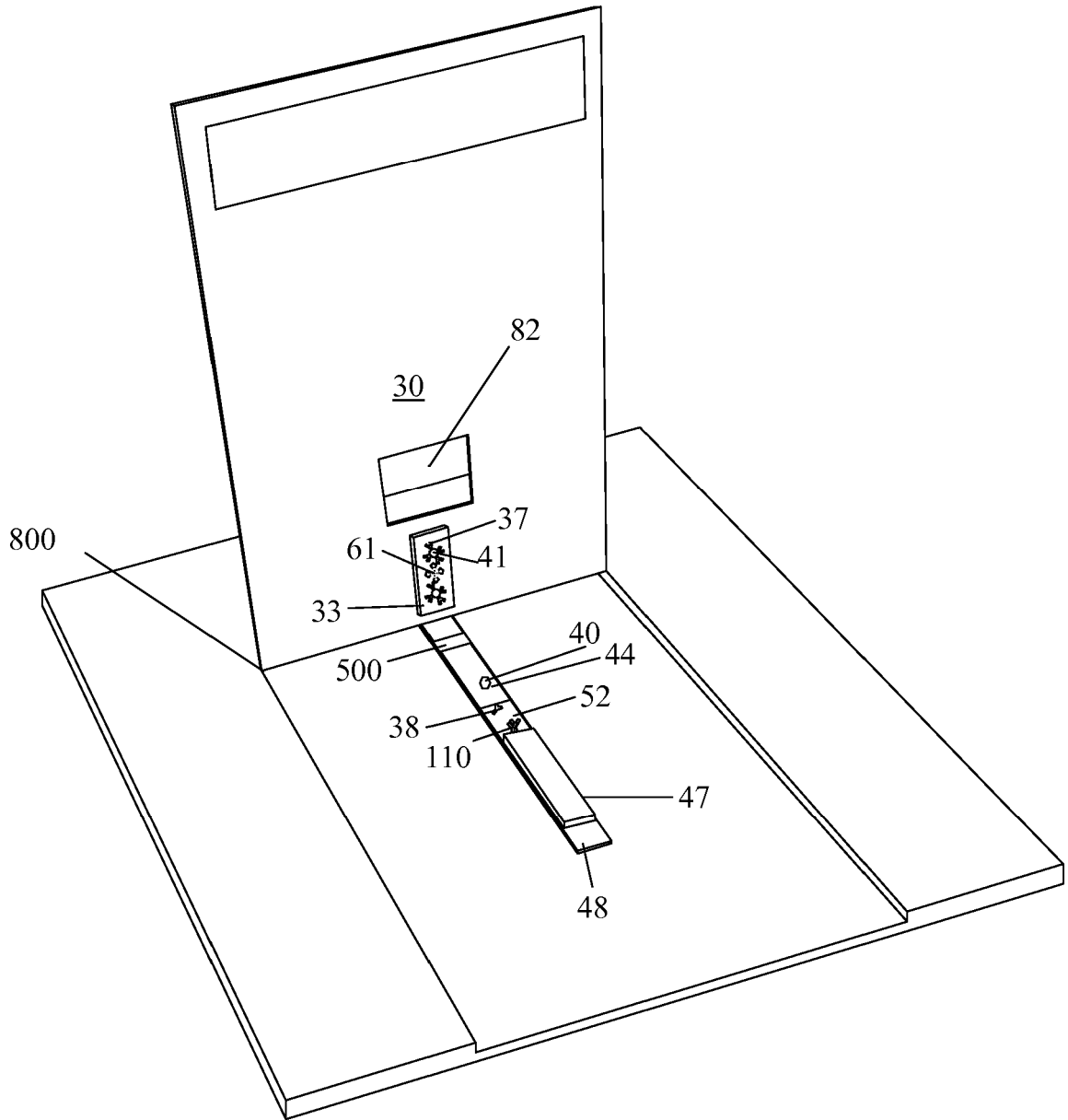


Fig. 46A

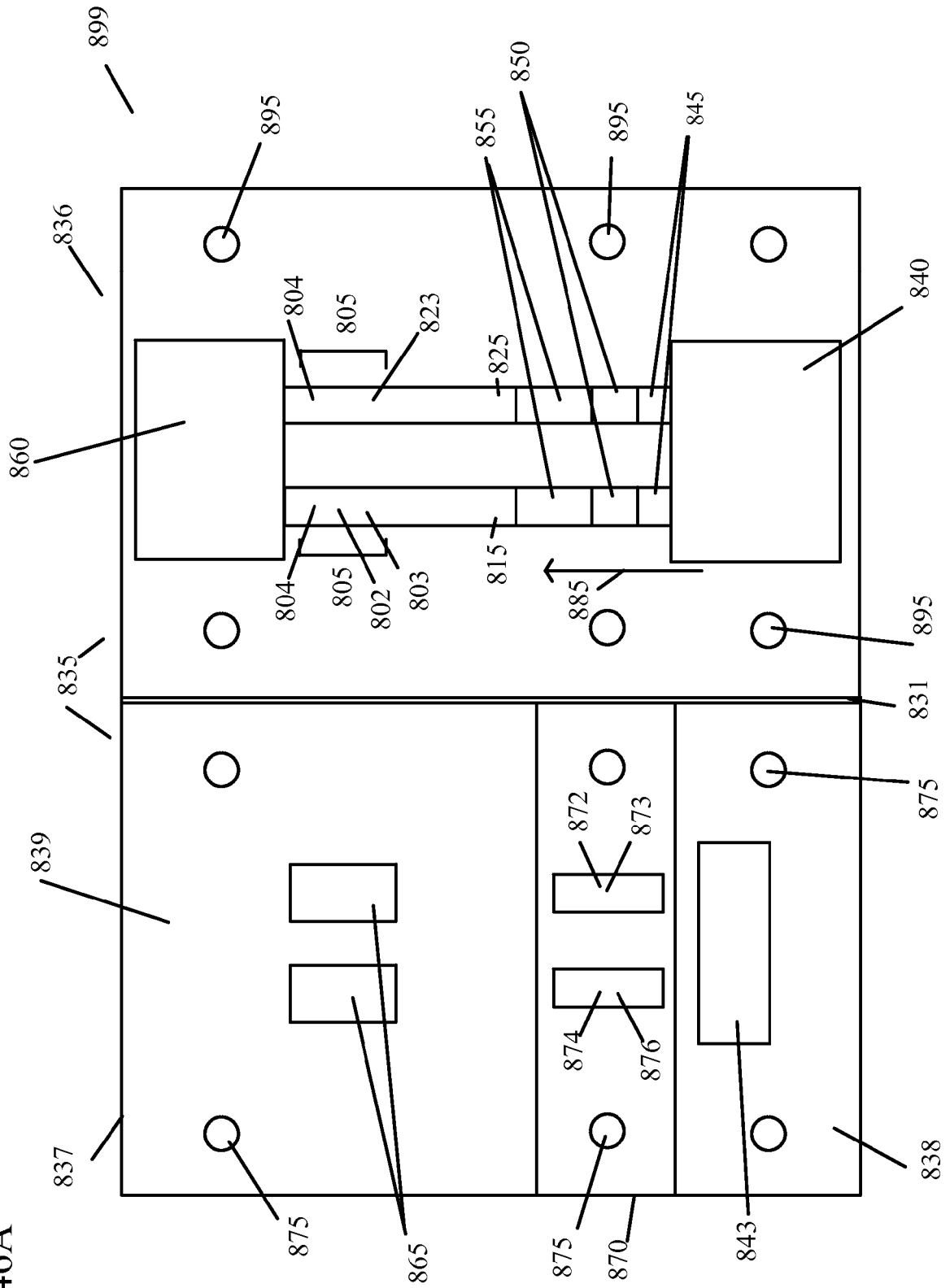


Fig. 46B

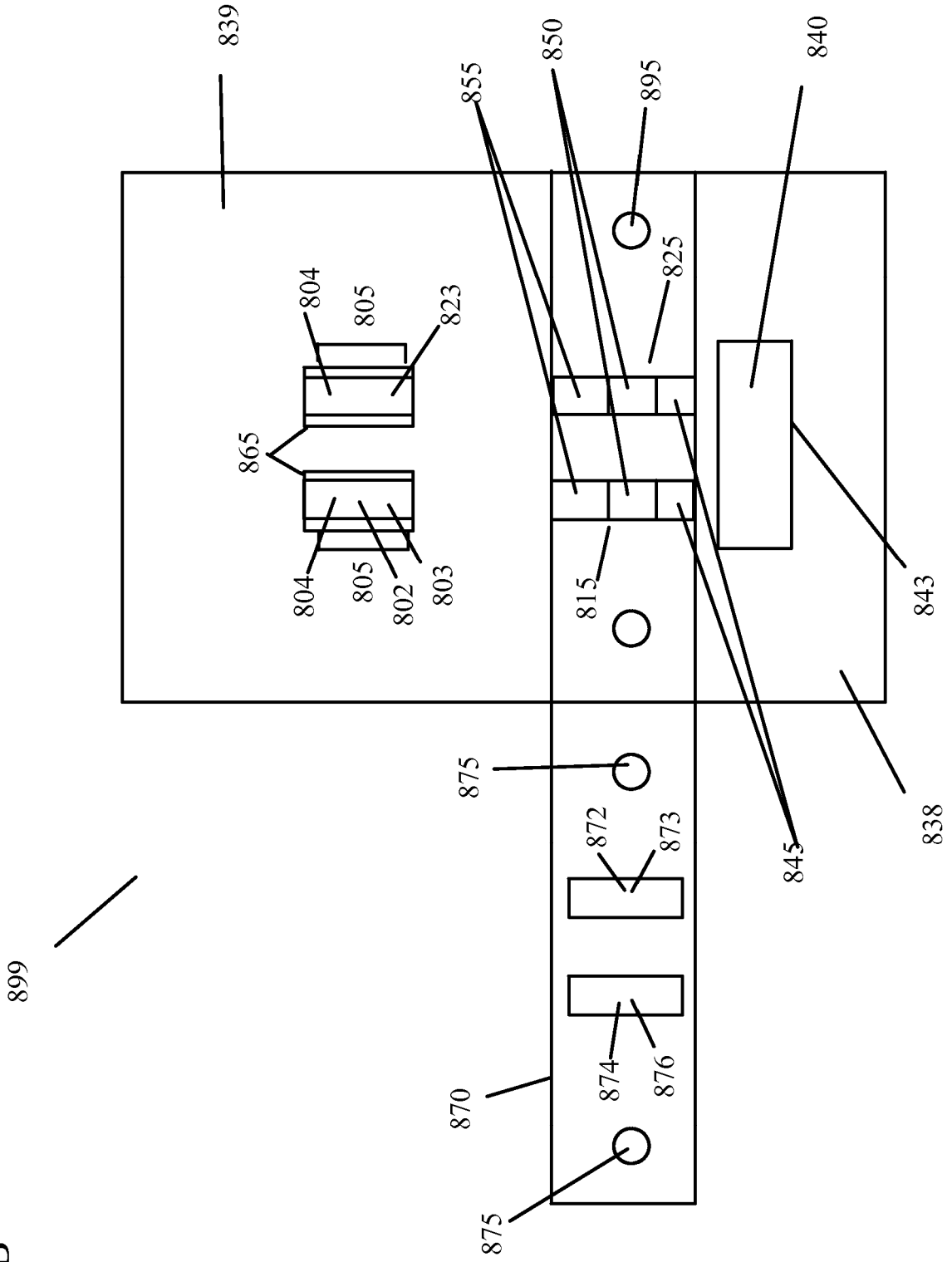


Fig. 46C

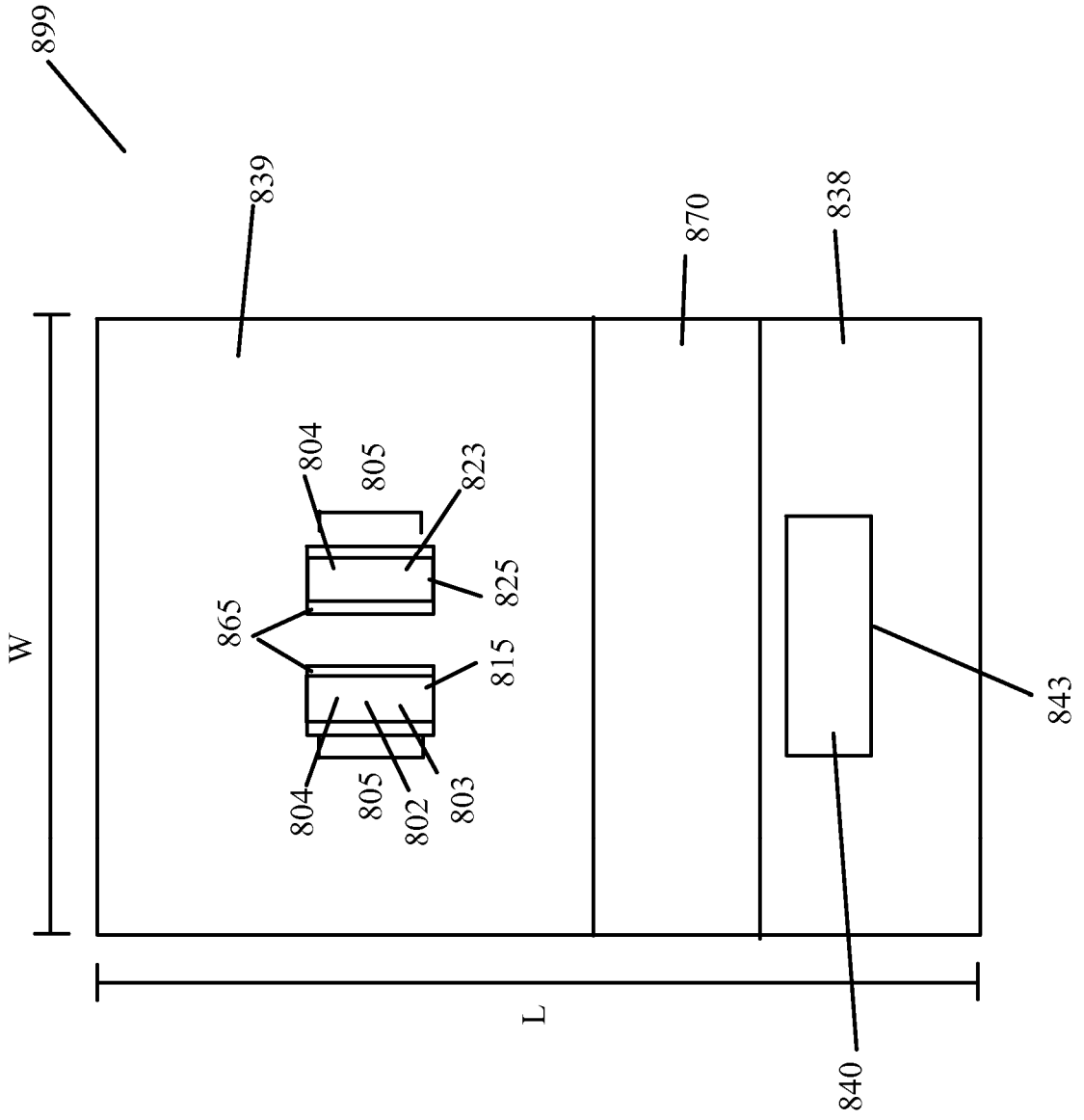


Fig. 47A

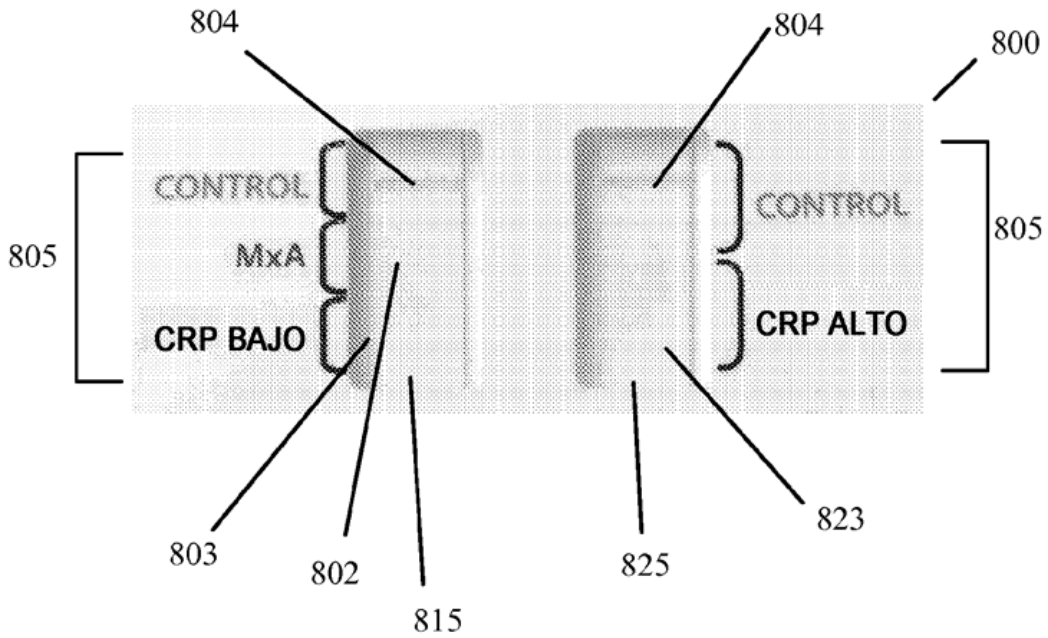


Fig. 47B

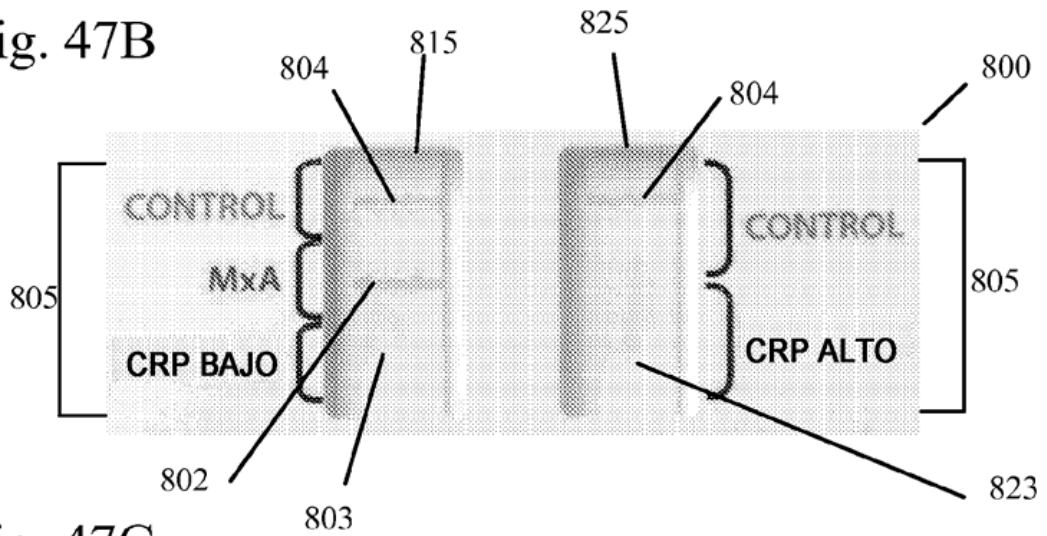
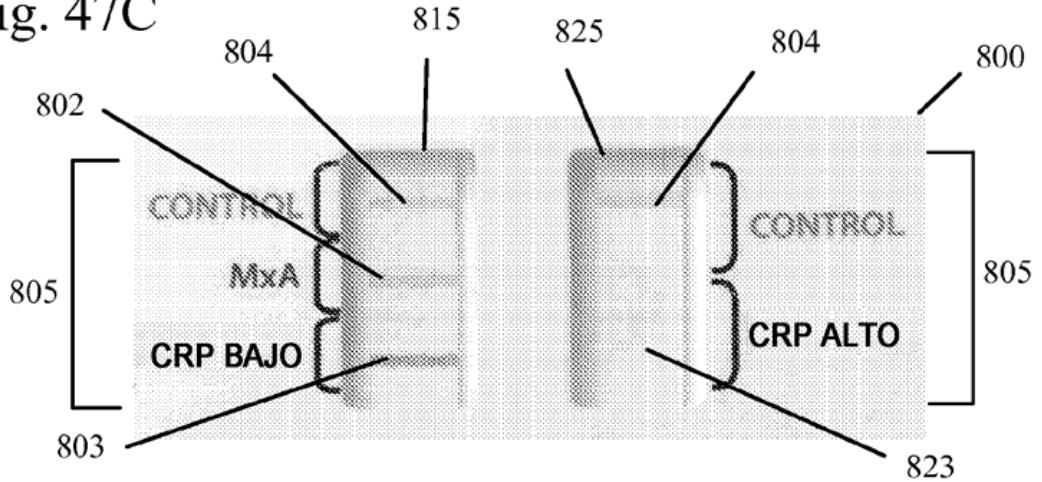


Fig. 47C



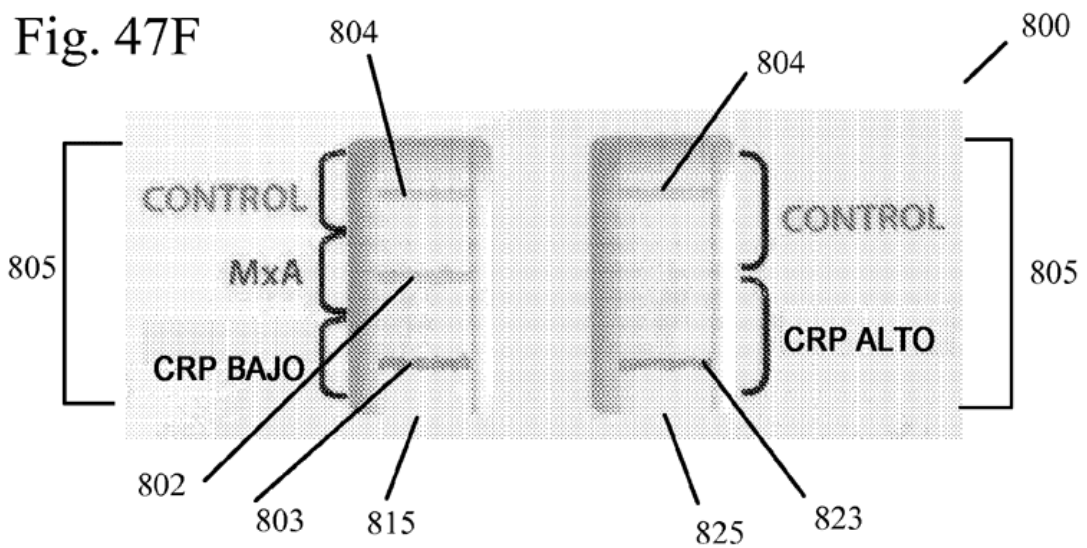
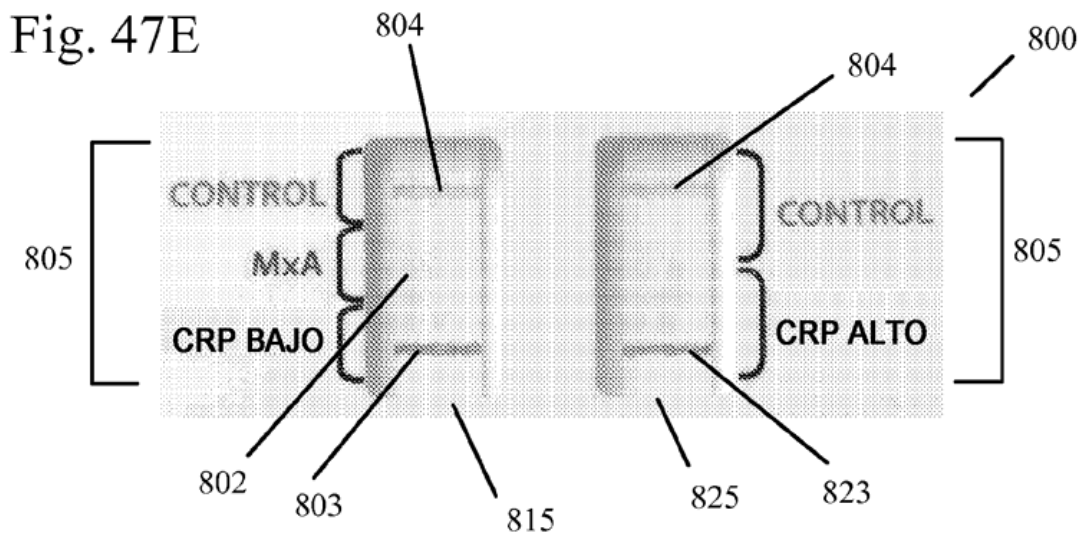
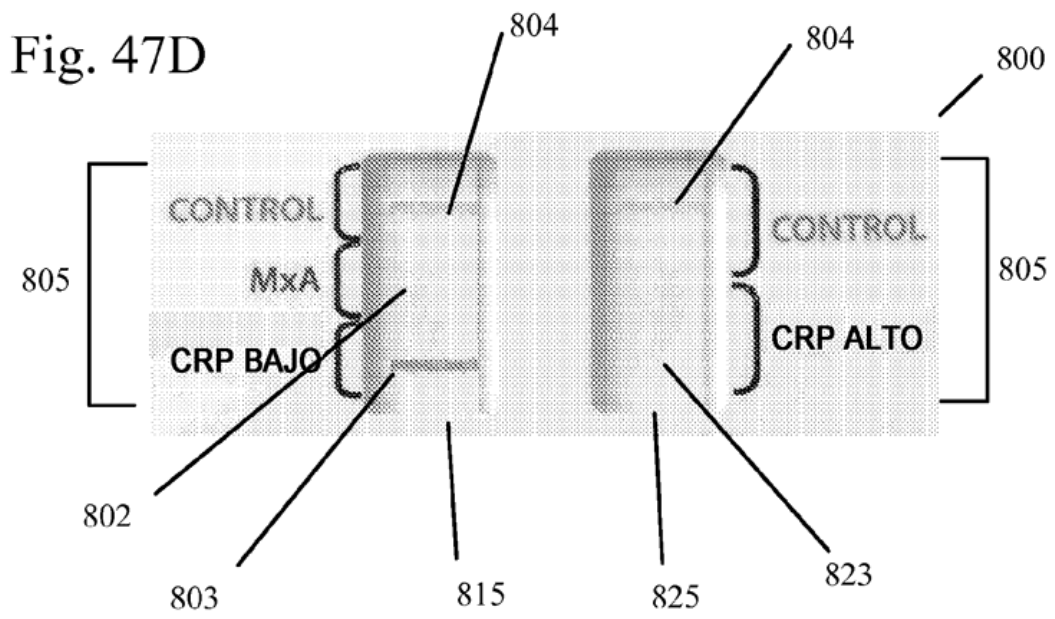


Fig. 48A

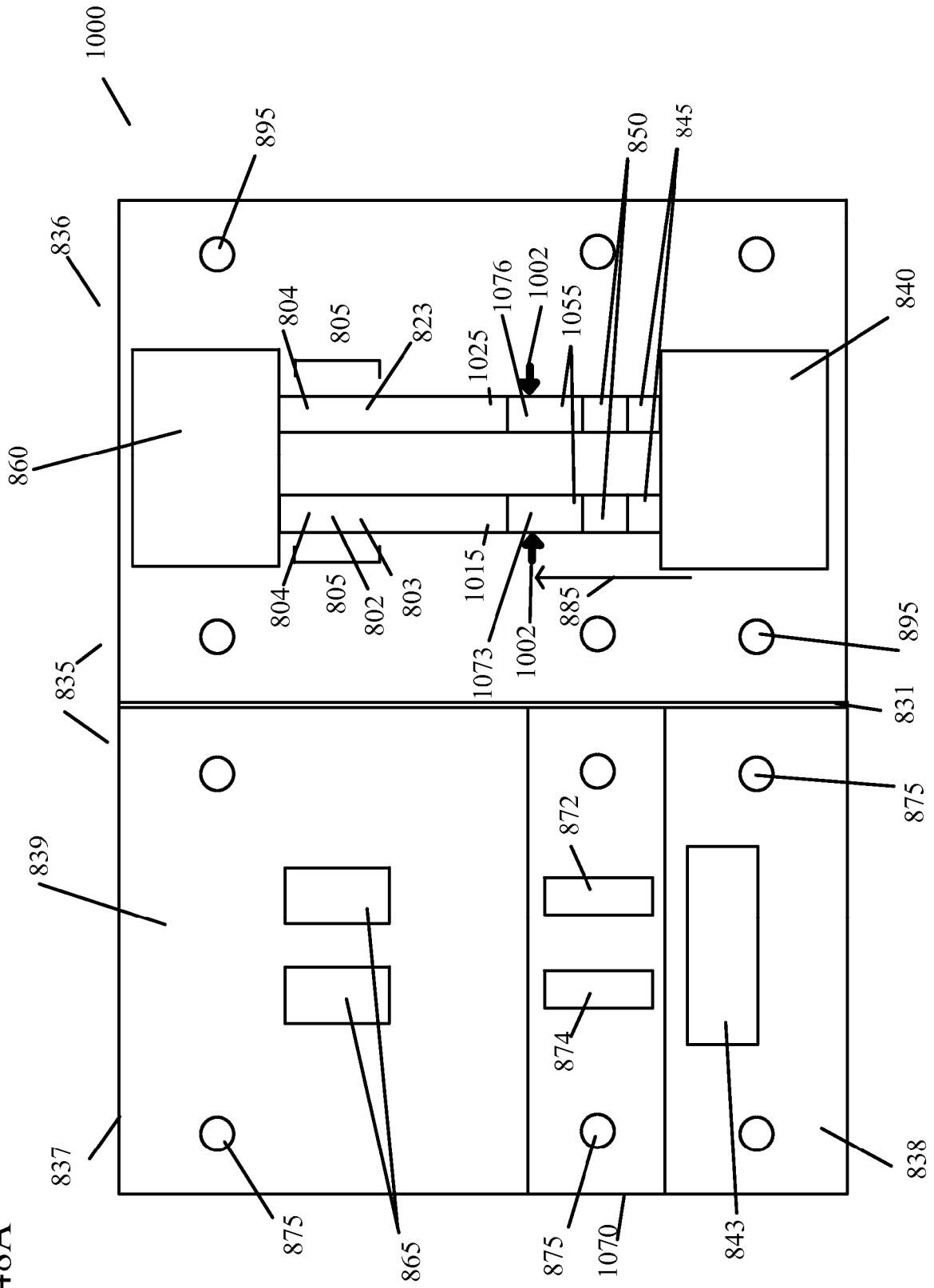


Fig. 48B

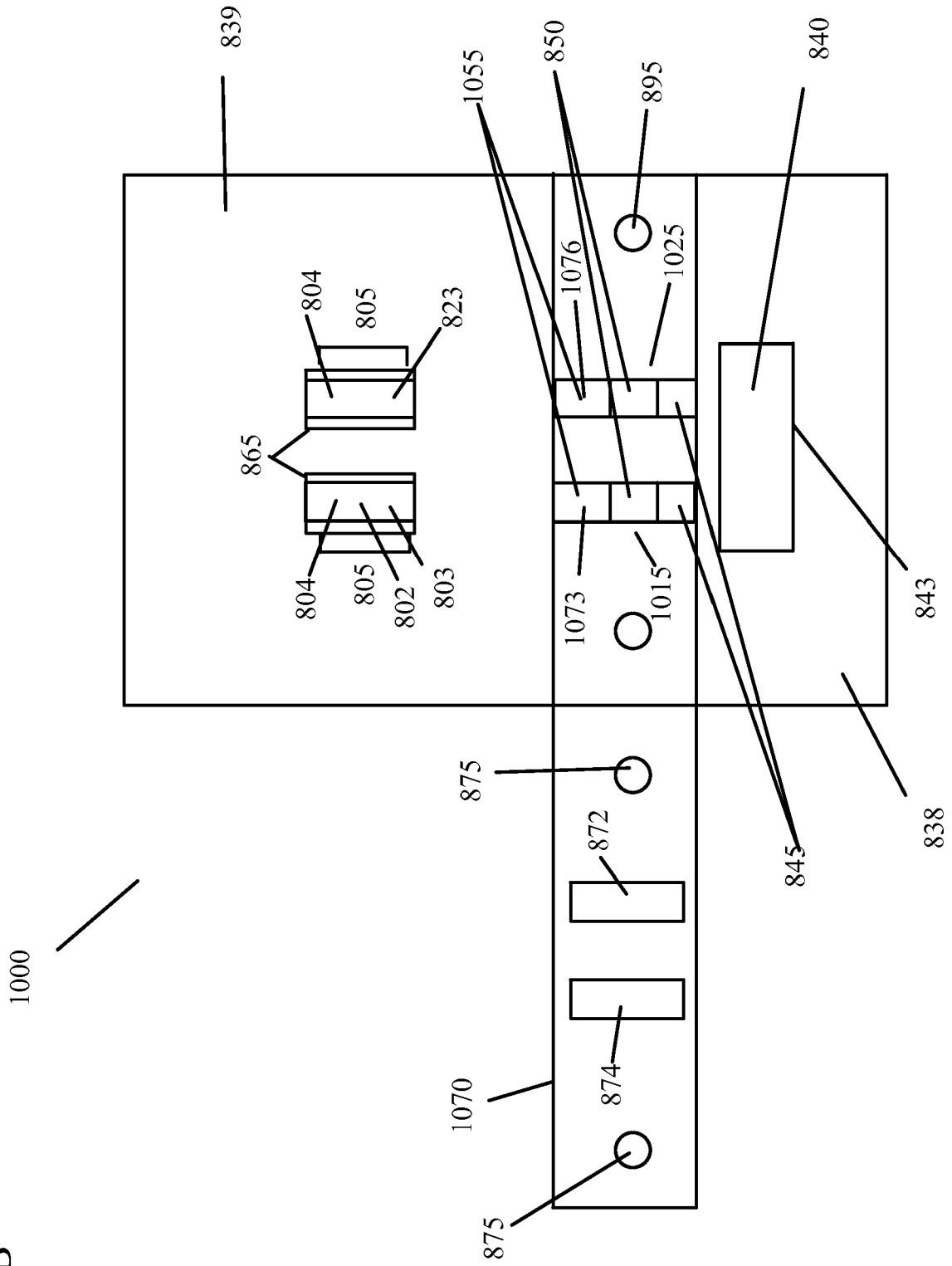


Fig. 48C

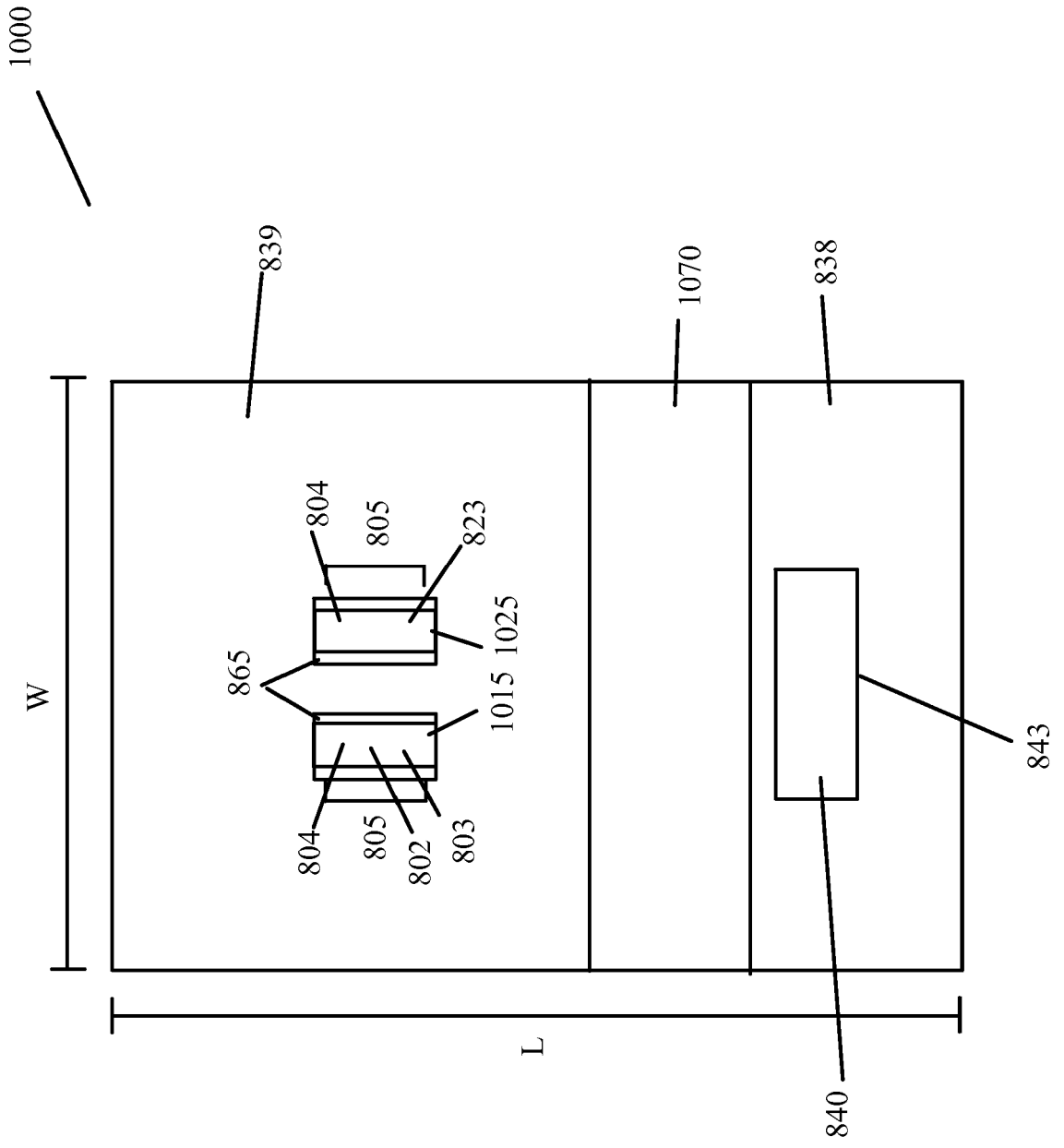


Fig. 49

