

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 114**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2012 PCT/US2012/024242**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12109303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2012 E 12744701 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2673641**

54 Título: **Dispositivo y método de inmunoensayo de doble trayectoria de etapa reducida**

30 Prioridad:
10.02.2011 US 201113024422

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

73 Titular/es:
**CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC. (100.0%)
3661 Horse Block Road
Medford, NY 11763, US**

72 Inventor/es:
ESFANDIARI, JAVANBAKSH

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 637 114 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método de inmunoensayo de doble trayectoria de etapa reducida

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere ampliamente a dispositivos de ensayo de inmunoensayo para determinar la presencia de un ligando en una muestra (tal como un fluido corporal) y métodos para su uso. Más particularmente esta invención se refiere a dispositivos de ensayo para su uso como tiras cromatográficas de ensayo rápido.

10

2. Estado de la técnica

Se han usado muchos tipos de ensayos de ligando-receptor para detectar la presencia de diversas sustancias, a menudo llamados en líneas generales ligandos, en fluidos corporales tales como sangre, orina, o saliva. Estos ensayos implican reacciones de anticuerpos con antígenos, conjugados sintéticos que comprenden marcas de poliestireno o de sol metálico radiactivas, enzimáticas, fluorescentes o visualmente observables, y cámaras de reacción diseñadas especialmente. En todos estos ensayos, hay un receptor, por ejemplo, un anticuerpo, que es específico para el ligando o antígeno seleccionado, y un medio para detectar la presencia, y en algunos casos la cantidad, del producto de reacción de ligando-receptor. Algunos ensayos se diseñan para hacer una determinación cuantitativa, pero en muchas circunstancias todo lo que se requiere es una indicación cualitativa positiva/negativa. Los ejemplos de dichos ensayos cualitativos incluyen el tipado de la sangre, los tipos principales de análisis de orina, pruebas de embarazo y ensayos de SIDA. Para estos ensayos, se prefiere un indicador visualmente observable tal como la presencia de aglutinación o un cambio de color.

15

20

25

Incluso los ensayos cualitativos deben ser muy sensible a causa de la concentración a menudo pequeña del ligando de interés en el fluido de ensayo. Los falsos positivos también pueden ser problemáticos, particularmente con la aglutinación y otros métodos de detección rápida tales como ensayos de tira reactiva y cambio de color. A causa de estos problemas, se han desarrollado los llamados ensayos "de tipo sándwich" y otros mecanismos de detección sensibles que usan soles metálicos u otros tipos de partículas coloreadas.

30

En un ensayo "de tipo sándwich", un analito diana tal como un antígeno se "empareda" entre un anticuerpo marcado y un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido. El ensayo se lee observando la presencia y/o cantidad de complejo de antígeno unido-anticuerpo marcado. En un inmunoensayo "de competición", el anticuerpo unido a una superficie sólida se pone en contacto con una muestra que contiene una cantidad desconocida de analito antígeno y con antígeno marcado del mismo tipo. La cantidad de antígeno marcado unido a la superficie sólida se determina entonces para proporcionar una medida indirecta de la cantidad de analito antígeno en la muestra.

35

Como estos y otros ensayos pueden detectar tanto anticuerpos como antígenos, generalmente se mencionan como ensayos inmunoquímicos de ligando-receptor o simplemente inmunoensayos.

40

Los dispositivos de inmunoensayo en fase sólida, sean del tipo sándwich o de competición, proporcionan detección sensible de un analito en una muestra de fluido biológico tal como sangre, orina o saliva. Los dispositivos de inmunoensayo en fase sólida incorporan un soporte sólido al que se une un miembro de un par de ligando-receptor, habitualmente un anticuerpo, antígeno o hapteno. Las primeras formas habituales de soportes sólidos eran placas, tubos o micropartículas de poliestireno que eran bien conocidas de los campos de radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático. En la última década, se han empleado varios materiales porosos tales como nailon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

45

Se han descrito varios kits de inmunoensayo autocontenidos que usan materiales porosos como vehículos en fase sólida de componentes inmunoquímicos tales como antígenos, haptenos o anticuerpos. Estos kits son habitualmente de diseño de tira reactiva, flujo directo o migratorio.

50

En las formas más habituales de ensayos de tira reactiva, tipificados por los kits de embarazo y detección de la ovulación para uso en el hogar, los componentes inmunoquímicos tales como los anticuerpos se unen a una fase sólida. El dispositivo de ensayo se "sumerge" para la incubación en una muestra sospechosa de contener analito antígeno desconocido. El anticuerpo marcado con enzima entonces se añade, simultáneamente o después de un periodo de incubación. El dispositivo después se lava y se inserta en una segunda solución que contiene un sustrato para la enzima. El marcador enzimático, si está presente, interactúa con el sustrato, causando la formación de productos coloreados que se depositan según precipitan en la fase sólida o producen un cambio de color visible en la solución de sustrato.

55

60

Los dispositivos de inmunoensayo del tipo de flujo directo se diseñaron para obviar la necesidad de incubación extensiva y etapas de lavado problemáticas asociadas con los ensayos de tira reactiva. Valkirs *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.632.901, divulgan un dispositivo que comprende anticuerpo (específico para un analito antígeno diana) unido a una membrana porosa o filtro a la que se añade una muestra líquida. Según el líquido fluye a través de la membrana, el analito diana se une al anticuerpo. La adición de muestra va seguida por la adición de

65

anticuerpo marcado. La detección visual del anticuerpo marcado proporciona una indicación de la presencia de analito antígeno diana en la muestra.

5 Korom *et al.*, documento EP-A 0 299 359, divulgan una variación en el dispositivo de flujo directo en que el anticuerpo marcado se incorpora en una membrana que actúa como sistema de suministro de reactivo.

El requisito de múltiples etapas de adición y lavado con los dispositivos de inmunoensayo de tipo tira reactiva y de flujo directo aumenta la probabilidad de que personal mínimamente formado y los usuarios en el hogar obtengan resultados de ensayo erróneos.

10 En los ensayos de tipo migración, se impregna una membrana con los reactivos necesarios para realizar el ensayo. Se proporciona una zona de detección de analito en que el analito marcado se une y se leen los indicios del ensayo. Véase, por ejemplo, Tom *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.366.241, y Zuk, *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.596.275. La sensibilidad de los ensayos de tipo migración frecuentemente se reduce, sin embargo, por la presencia o formación en la muestra de componentes sólidos indeseables que bloquean el paso del analito marcado a la zona de detección. La sensibilidad del ensayo también disminuye cuando los dispositivos de ensayo de migración se inundan con demasiada muestra líquida.

20 Los dispositivos de ensayo de migración habitualmente incorporan dentro de los mismos reactivos que se han adherido a marcadores coloreados (es decir, conjugados), permitiendo de ese modo la detección visible de los resultados de ensayo sin la adición de sustancias adicionales. Véase, por ejemplo, Bernstein, patente de Estados Unidos n.º 4.770.853. Entre dichos marcadores están las partículas de sol de oro tales como las descritas por Leuvering en la patente de Estados Unidos n.º 4.313.734, partículas de sol de colorante tales como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 4.373.932 por Gribnau *et al.*, látex teñido tal como se describe por May *et al.*, documento WO 88/08534 y colorantes encapsulados en liposomas de Campbell *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.703.017. Los marcadores coloreados generalmente están limitados en términos de los métodos de inmovilización que son adecuados. Además, requieren una cantidad relativamente grande de molécula de ligando y pueden implicar reactivos caros, aumentando de ese modo el coste.

30 La patente de Estados Unidos 5736188 (D1) describe un dispositivo de ensayo con dos o más trayectorias, que permiten un suministro temporizado secuencial de los componentes de ensayo a un área de detección. El documento US2007/0184492 (D2) describe un dispositivo de ensayo de dos trayectorias con dos trayectorias separadas por una pared.

35 Los dispositivos divulgados en el documento PCT/US2006/008688 presentado el 10 de marzo de 2006 publicado como el documento WO 2006/099191 A2, n.º de serie de Estados Unidos 11/908,071 presentado el 7 de septiembre de 2007, y n.º de serie de Estados Unidos 61/338,303 presentado el 16 de febrero de 2010, superan muchas deficiencias de la técnica anterior proporcionando inmunoensayos "de doble trayectoria" que son dispositivos de detección rápidos muy sensibles, extremadamente fiables, precisos y económicos. Generalmente, los inmunoensayos de doble trayectoria incluyen un primer material absorbente (o tira) que tiene una primera localización para recibir una solución de tampón (en el caso de un sistema de conjugado seco) o una solución de conjugado (en el caso de un sistema de conjugado líquido) definiendo el primer material absorbente una primera trayectoria de flujo horizontal, teniendo un segundo material absorbente (o tira) una segunda localización para recibir una muestra definiendo el segundo material absorbente una segunda trayectoria de flujo horizontal distinta de la primera trayectoria de flujo, y una línea de ensayo o sitio de ensayo con antígenos o anticuerpos inmovilizados u otras moléculas de unión a ligando tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc., localizados en una zona de ensayo en la unión del primer y segundo material absorbente.

50 Específicamente, el documento WO2006/099191 (y divulgaciones similares, tales como el documento US2007/0148781) divulga un dispositivo de ensayo de inmunoensayo para su uso con un conjugado de inmunoensayo que tiene un marcador, siendo el dispositivo de ensayo para determinar la presencia de un ligando en una muestra líquida, y que comprende: a) una primera tira absorbente que tiene una localización para recibir solución dispuesta para recibir una solución de un conjugado de inmunoensayo que tiene un marcador o una solución de tampón cuando se usa un sistema seco que incluye un conjugado de inmunoensayo que tiene un marcador mantenido por la primera tira absorbente, y para definir una trayectoria de migración de solución horizontal; b) un sitio de ensayo que tiene un mecanismo de unión a ligando inmovilizado y que está en comunicación con la trayectoria de migración de solución; c) una segunda tira absorbente que tiene una localización para recibir la muestra dispuesta para recibir la muestra líquida; y d) una trayectoria de migración de muestra horizontal que se extiende desde la localización para recibir la muestra hasta el sitio de ensayo, siendo la segunda tira absorbente una pieza diferente a la primera tira absorbente, siendo la primera y segunda tira absorbente no paralelas, tocando y solapando la segunda tira absorbente con la primera tira absorbente en el sitio de ensayo, definiendo la segunda tira absorbente la trayectoria de migración horizontal de modo que la aplicación de la muestra líquida a la localización que recibe la muestra requiere que la muestra líquida fluya a través de la trayectoria de migración de la muestra hasta el sitio de ensayo, donde la trayectoria de migración de muestra horizontal es distinta de la trayectoria de migración de solución y no está en comunicación con la misma excepto a través del sitio de ensayo.

Diversos tipos de muestras pueden ensayarse de forma eficaz usando los inmunoensayos de doble trayectoria incluyendo, aunque sin limitación, sangre completa, suero sanguíneo, orina, esputo, saliva y heces. Para la mayoría de las muestras, es habitual utilizar solución de tampón para causar que la muestra fluya a lo largo del segundo material absorbente. Por tanto, un método de uso de un inmunoensayo de doble trayectoria implica:

- (1) depositar una muestra en la localización para recibir la muestra,
- (2) depositar una solución de tampón en la misma localización,
- (3) esperar un periodo de tiempo suficiente para permitir que la muestra alcance la zona de ensayo,
- (4) después de esperar, depositar solución de tampón adicional en la localización para recibir tampón de modo que la solución de tampón adicional cause que el conjugado fluya hasta la zona de ensayo, y
- (5) inspeccionar la zona de ensayo para determinar si el ensayo es positivo o negativo.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo de ensayo de inmunoensayo como se define en la reivindicación 1; otro aspecto de la invención proporciona un dispositivo de ensayo de inmunoensayo como se define en la reivindicación 11. En el dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o el dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, se proporciona un divisor en la localización para recibir tampón, estando dispuesto el divisor para dividir la solución de tampón en una primera cantidad y una segunda cantidad, de modo que la primera cantidad y la segunda cantidad estén dirigidas a trayectorias diferentes como se expone en las reivindicaciones respectivas. De acuerdo con el aspecto de la invención definida en la reivindicación 1, se proporciona un recipiente quebradizo para el tampón de modo que cuando se rompa el recipiente quebradizo el divisor divida el tampón en la primera y segunda cantidad. Dicho dispositivo de ensayo de inmunoensayo de acuerdo con la invención puede ser un dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de detección rápida que requiere el uso de menos etapas que los dispositivos previos de inmunoensayo de doble trayectoria, que es simple de usar y proporciona resultados precisos.

En una realización, se proporciona un dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de conjugado seco con una localización para recibir la muestra y una localización para recibir el tampón, siendo la primera tira absorbente para dirigir la primera trayectoria de migración (o flujo) para la muestra (siendo generalmente la primera trayectoria de flujo horizontal). Se proporciona un divisor para dividir la solución de tampón recibida en la localización que recibe la muestra de modo que parte de la solución de tampón se dirija a la primera tira absorbente que dirige la muestra, y parte de la solución de tampón se dirija a una segunda tira absorbente. En una realización, la segunda tira absorbente adopta una trayectoria alargada (por ejemplo, trayectoria curvada, angulada o tortuosa) hasta un sitio de ensayo que típicamente está localizado en la unión de una trayectoria alargada de la segunda tira absorbente con la primera tira absorbente.

En otra realización, la segunda tira absorbente se proporciona con un elemento de retardo a lo largo de su longitud. En otra realización más, se proporciona una segunda y una tercera tira absorbente, recibiendo inicialmente la tercera tira absorbente la solución de tampón y teniendo una característica de flujo más lento que la primera tira absorbente, y la segunda tira absorbente está en contacto con la tercera tira absorbente y hace avanzar la solución de tampón hasta el sitio de ensayo que está localizado en la unión de la segunda tira absorbente y la primera tira absorbente. Independientemente, el conjugado se proporciona en una localización a lo largo de la segunda tira absorbente. Preferiblemente, la trayectoria de flujo proporcionada por la primera tira absorbente es una trayectoria directa hasta el sitio de ensayo. El sitio de ensayo incluye preferiblemente una o más líneas de ensayo o sitios de ensayo con antígenos o anticuerpos inmovilizados u otras moléculas de unión a ligando tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc.

Cuando el dispositivo de ensayo de inmunoensayo de la invención se proporciona en una carcasa, la carcasa típicamente se proporciona con una primera abertura adyacente a la localización que recibe la muestra y una segunda abertura adyacente a la localización que recibe el tampón. Puede proporcionarse una ventana de visualización en la carcasa por encima del sitio de ensayo.

Pueden proporcionarse diversos divisores para dividir la solución de tampón recibida en la localización que recibe el tampón. Un primer divisor es un elemento de cuña (con forma de V o de sección transversal triangular) localizado en la localización que recibe el tampón para recibir la solución de tampón (por ejemplo, una abertura en una carcasa), donde el ápice de la V o el triángulo está dirigido hacia arriba. A medida que gotean las gotas de solución de tampón en la abertura que recibe el tampón, el ápice divide las gotas en dos corrientes. La primera corriente está dirigida al primer material absorbente. La segunda corriente está dirigida al segundo material absorbente de trayectoria alargada.

Un segundo divisor alternativo para dividir la solución de tampón recibida en la localización que recibe el tampón es un material de control de flujo que se elige para permitir que el tampón fluya, pero que es resistente a recibir la muestra. Dicho material de control de flujo está acoplado tanto a la primera como a la segunda tira absorbente.

Un tercer divisor posible para dividir la solución de tampón recibida en la localización que recibe el tampón es una disposición donde la localización que recibe el tampón es una abertura en una carcasa con la dimensión adecuada para recibir la punta de un distribuidor de tampón, y se proporciona una pared vertical rebajada en la abertura de la

carcasa para dividir la solución de tampón. Preferiblemente, la primera tira absorbente se proporciona en un lado de la pared vertical y la segunda tira absorbente se proporciona en el otro lado de la pared vertical.

5 De acuerdo con un aspecto de la invención, el divisor para dividir la solución de tampón puede disponerse de modo que aproximadamente la mitad de la solución de tampón se dirija hacia la primera tira absorbente y la otra mitad de la solución de tampón se dirija hacia la segunda tira absorbente.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, el divisor para dividir la solución de tampón puede disponerse de modo que una primera proporción deseada de la solución de tampón se dirija hacia la primera tira absorbente y una segunda proporción diferente deseada de la solución de tampón se dirija hacia la segunda tira absorbente.

En una realización, las localizaciones respectivas para recibir la muestra y la solución de tampón están cerca o adyacentes entre sí.

15 En la realización preferida de la invención, la primera tira absorbente y la segunda tira absorbente son piezas diferentes que se superponen entre sí en la unión del sitio de ensayo, y la línea de ensayo está impresa en una o ambas tiras absorbentes en la unión. El dispositivo de ensayo de la invención incluye un sitio de control (tal como una línea) que típicamente puede observarse desde una ventana de visualización.

20 De acuerdo con un aspecto de la invención, un dispositivo de ensayo de inmunoensayo como se describe anteriormente puede usarse (1) depositando una muestra en la localización que recibe la muestra, (2) depositando la solución de tampón en la localización que recibe el tampón, y (3) después de un periodo de tiempo deseado, inspeccionando el sitio de ensayo para determinar si el ensayo es positivo o negativo. Se aprecia que tiene que depositarse suficiente tampón en la localización que recibe el tampón para causar que la muestra se mueva a lo largo de la primera tira absorbente hasta el sitio de ensayo, así como para atravesar la trayectoria de la segunda tira absorbente (y cuando se proporciona, la tercera) y cause que el conjugado se mueva hasta el sitio de ensayo. A causa de la disposición de la primera tira absorbente, así como la segunda tira absorbente (y cuando se proporciona, la tercera), la muestra se lleva al sitio de ensayo por anticipado del conjugado.

30 Los materiales, grosores y longitudes de la primera y segunda tira absorbente se eligen para ajustar la cronología respecto a la muestra y el conjugado que alcanzan el sitio de ensayo.

35 En un ensayo de cuarta generación, se proporcionan dos trayectorias para dirigir la muestra a dos sitios de ensayo, y se proporcionan dos trayectorias alargadas para transportar el tampón y el conjugado a los sitios de ensayo. Se proporciona un primer sitio de ensayo en la intersección de una de las trayectorias alargadas con una de las dos trayectorias de muestra, y se proporciona un segundo sitio de ensayo en una intersección de la otra trayectoria alargada y la segunda trayectoria de muestra. En un ensayo de cuarta generación, uno de los sitios de ensayo puede ensayar los antígenos en la muestra mientras que el otro sitio de ensayo puede ensayar anticuerpos en la muestra.

40 Llegarán a ser evidentes objetivos y ventajas adicionales de la invención para los expertos en la materia tras la referencia a la descripción detallada tomada junto con las figuras adjuntas, en que:

45 La figura 1 es una vista esquemática de una primera realización del dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención.

La figura 2 es una vista esquemática de una segunda realización del dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención.

50 La figura 3a es una vista esquemática de una tercera realización del dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención.

La figura 3b es una vista esquemática del dispositivo de ensayo acuerdo con una tercera realización alternativa de la invención.

55 La figura 4 es una vista esquemática del dispositivo de ensayo de acuerdo con una cuarta realización de la invención.

60 La figura 5 es una vista esquemática del dispositivo de ensayo de acuerdo con una quinta realización de la invención.

La figura 6 es una vista esquemática de dispositivo de ensayo de acuerdo con una sexta realización de la invención.

65 La figura 7 es una vista lateral de una primera realización de un divisor de tampón para su uso con cualquiera de los dispositivos de ensayo de acuerdo con la invención.

La figura 8 es una vista superior de una segunda realización de un divisor de tampón para su uso con cualquiera de los dispositivos de ensayo de acuerdo con la invención.

5 La figura 9 es una vista superior de una tercera realización de un divisor de tampón sin el cuentagotas para su uso con cualquiera de los dispositivos de ensayo de acuerdo con la invención.

La figura 9a es una vista lateral de la tercera realización del divisor de tampón.

10 La figura 10 es una vista en sección transversal de un botón de tampón (recipiente quebradizo) para su uso con cualquiera de los dispositivos de ensayo de acuerdo con la invención.

15 Antes de volver a las figuras, las aplicaciones mencionadas anteriormente se indican proporcionando ejemplos de dispositivos de inmunoensayo de doble trayectoria relevantes para la presente invención. En particular, muchos de los mismos elementos descritos en las realizaciones de las aplicaciones mencionadas anteriormente se utilizan como componentes básicos para las realizaciones de la invención que se describen adicionalmente a continuación. Como resultado, los detalles de esos elementos no se describen adicionalmente, y puede ponerse atención en aquellas aplicaciones para los detalles adicionales.

20 Volviendo ahora a la figura 1, se proporciona una primera realización de un sistema de dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de conjugado seco 1000. El sistema 1000 incluye una celda de ensayo 1010 con una primera localización 1026 para recibir una muestra y una segunda localización 1024 para recibir una solución de tampón. Se proporciona un primer material absorbente o secante 1032 para dirigir una trayectoria de flujo horizontal 1061 para la muestra. Se proporcionan los medios analizados a continuación con referencia a las figuras 7-9a para dividir la solución de tampón recibida en la segunda localización 1024 de modo que parte de la solución de tampón se dirija al primer material absorbente 1032 que dirige la muestra, y parte de la solución de tampón se dirige a un segundo material absorbente o secante 1030. En la realización de la figura 1, el segundo material absorbente 1030 se observa adoptando una trayectoria alargada 1062 hasta la zona de ensayo 1033 que está localizada en la unión de la trayectoria alargada del segundo material absorbente 1030 con el primer material absorbente 1032. La zona de ensayo 1033 incluye una o más líneas o indicadores de ensayo (por ejemplo, 1050A, 1050B) que han inmovilizado antígenos o anticuerpos en el material absorbente 1030 o el material absorbente 1032. Preferiblemente, se proporciona una línea de control 1060 posterior a la línea o líneas de ensayo, y puede proporcionarse también un depósito opcional o zona de mecha 1037. El conjugado 1039 que tiene antígenos o anticuerpos deseados con marcadores coloreados adheridos, se inmoviliza a lo largo de la trayectoria alargada 1062 en o sobre el segundo material absorbente 1030 anterior a la zona de ensayo 1033. Como se muestra en la figura 1, el conjugado 1039 está preferiblemente localizado hacia el extremo de la zona de ensayo de la trayectoria alargada. La trayectoria alargada 1062 del segundo material absorbente 1030 de la figura 1 se muestra tortuoso y de más de cinco veces la longitud de la trayectoria del flujo horizontal 1061 para la muestra. De esta manera, si la muestra se deposita primero en la primera localización 1026, y después se deposita el tampón en la segunda localización 1024, el tampón causará que la muestra alcance la zona de ensayo 1033 a través de la trayectoria 1061 y permite que los antígenos o anticuerpos en la muestra se unan a los anticuerpos o antígenos en las líneas de ensayo 1050A, 1050B por anticipado del conjugado 1039 que se transporta por el tampón que alcanza la zona de ensayo a través de la trayectoria alargada 1062.

45 Una segunda realización de un sistema de dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de conjugado seco 1100 se observa en la figura 2. El sistema 1100 incluye una celda de ensayo 1110 con una primera localización 1126 para recibir una muestra y una segunda localización 1124 para recibir una solución de tampón. Se proporciona un primer material absorbente o secante 1132 para dirigir una trayectoria de flujo horizontal 1161 para la muestra. Se proporcionan los medios analizados a continuación con referencia a las figuras 7-9a para dividir la solución de tampón recibida en la segunda localización 1124 de modo que parte de la solución de tampón se dirija al primer material absorbente 1132 que dirige la muestra, y parte de la solución de tampón se dirige a un segundo material absorbente o secante 1130. En la realización de la figura 2, el segundo material absorbente 1130 se observa adoptando una trayectoria alargada 1162 hasta la zona de ensayo 1133 que está localizada en la unión de la trayectoria alargada del segundo material absorbente 1130 con el primer material absorbente 1132. La zona de ensayo 1133 incluye una o más líneas o indicadores de ensayo (por ejemplo, 1150A, 1150B) que han inmovilizado antígenos o anticuerpos en el material absorbente 1130 o el material absorbente 1132. Preferiblemente, se proporciona una línea de control 1160 posterior a la línea o líneas de ensayo, y puede proporcionarse también un depósito opcional o zona de mecha 1137. El conjugado 1139 que tiene antígenos o anticuerpos deseados con marcadores coloreados adheridos, se inmoviliza a lo largo de la trayectoria alargada 1162 en o sobre el segundo material absorbente 1130 anterior a la zona de ensayo 1133. Como se muestra en la figura 1, el conjugado 1139 está preferiblemente localizado hacia el extremo de la zona de ensayo de la trayectoria alargada. La trayectoria alargada 1162 del segundo material absorbente 1130 de la figura 1 se muestra curvado y aproximadamente cuatro veces la longitud de la trayectoria del flujo horizontal 1161 para la muestra. De esta manera, si la muestra se deposita primero en la primera localización 1126, y después se deposita el tampón en la segunda localización 1124, el tampón causará que la muestra alcance la zona de ensayo 1133 a través de la trayectoria 1161 y permite que los antígenos o anticuerpos en la muestra se unan a los anticuerpos o antígenos en las líneas de ensayo 1150A, 1150B

por anticipado del conjugado 1139 que se transporta por el tampón que alcanza la zona de ensayo a través de la trayectoria alargada 1162.

5 Terceras realizaciones alternativas de un sistema de dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de conjugado seco 1200a, 1200b se observan en la figura 3a y 3b. Las terceras realizaciones alternativas son similares al sistema de la segunda realización 1100 excepto en que en lugar de proporcionar trayectorias alargadas 1262a, 1262b para el tampón que son aproximadamente cuatro veces la longitud de las mismas trayectorias 1261a, 1261b, las trayectorias curvadas 1262a, 1262b son aproximadamente cuatro veces la longitud de las trayectorias de muestra 1261a, 1261b, las trayectorias curvadas 1262a, 1262b son aproximadamente dos veces tan largas como las trayectorias de muestra, pero se proporcionan con un elemento de retardo 1295a, 1295b a lo largo de sus longitudes. En la realización de la figura 3a, el elemento de retardo 1295a es un estrechamiento o cuello de botella en la trayectoria de flujo que limita la capacidad de flujo a través del mismo. La realización de la figura 3b, el elemento de retardo 1295b es un material viscoso (por ejemplo, azúcar) o un agente de boqueo (por ejemplo, BSA - seroalbúmina bovina). El elemento de retardo 1295b se utiliza para retardar el flujo de tampón a lo largo del segundo material absorbente 1230a, 1230b de modo que el tampón depositado en la segunda localización 1216a, 1216b (y dividido por el medio analizado a continuación con referencia a las figuras 7-9a) causará que la muestra depositada en la primera localización 1226a, 1226b alcance la zona de ensayo 1233a, 1233b a través de la trayectoria 1261a, 1261b y permitirá que los antígenos o anticuerpos en la muestra se unan a los anticuerpos o antígenos en la línea de ensayo 1250a, 1250b antes de que el conjugado 1239a, 1239b sea transportado por el tampón que alcanza la zona de ensayo a través de la trayectoria alargada 1262a, 1262b que incluye el elemento de retardo 1295a, 1295b. Además, si se desea, pueden proporcionarse múltiples elementos de retardo a lo largo del segundo material absorbente. Las terceras realizaciones alternativas también incluyen preferiblemente líneas de control en las zonas 1250a, 1250b y zonas de mecha 1237a, 1237b.

25 Una cuarta realización de un sistema de dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de conjugado seco 1300 se observa en la figura 4. La cuarta realización es similar a los sistemas de la tercera realización alternativa 1200a, 1200b excepto que, en lugar de proporcionar un elemento de retardo a lo largo de la longitud del segundo material absorbente o secante, se proporciona un tercer material absorbente o secante 1330A entre la segunda localización de recepción 1324 y el segundo material absorbente 1330. El tercer material absorbente 1330A se selecciona para que tenga una característica de flujo más lento que el primer material absorbente 1332 o el segundo material absorbente 1330. El material de conjugado 1339 está localizado preferiblemente a lo largo del segundo material absorbente 1330, aunque podría estar localizado a lo largo del tercer material absorbente 1330A. La zona de ensayo 1333 con una o más líneas de ensayo 1350A, 1350B está localizada en la intersección del primer material absorbente 1332 y el segundo material absorbente 1330, y una zona de control 1360 con un indicador de control, así como una zona de mecha 1337 preferiblemente se proporcionan posteriormente de la zona de ensayo 1333. Con la disposición proporcionada, si primero se deposita una muestra en la primera localización 1326, y después se deposita el tampón en la segunda localización 1324 (y se divide por el medio analizado a continuación con referencia a las figuras 7-9a), el tampón causará que la muestra alcance la zona de ensayo 1333 a través de la trayectoria 1361 y permita que los antígenos o los anticuerpos en la muestra se unan a los anticuerpos o antígenos en las líneas de ensayo 1350A, 1350B antes que el conjugado 1339 se transporte por el tampón que alcanza la zona de ensayo a través de la trayectoria alargada 1362 que incluye el tercer material absorbente 1330A y el segundo material absorbente 1330.

45 Una quinta realización de un sistema de dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de conjugado seco 1400 se observa en la figura 5 y proporciona un dispositivo de inmunoensayo de cuarta generación. La quinta realización es similar a la cuarta realización excepto en que se establecen dos muestras diferentes, se establecen dos trayectorias alargadas para el tampón (y el conjugado) y se establecen dos zonas de ensayo; típicamente, una para el ensayo de antígenos y la otra para el ensayo de anticuerpos. Más particularmente, el sistema 1400 incluye una celda de ensayo 1410 con una primera localización 1426 para recibir una muestra y una segunda localización 1424 para recibir una solución de tampón. Se proporciona un primer material absorbente o secante 1432a, 1432b para dirigir las trayectorias de flujo horizontal 1461a, 1461b para la muestra. El primer material absorbente puede estar hecho de un único trozo de material o múltiples trozos de material. El medio analizado a continuación con referencia a las figuras 7-9b se proporciona para dividir la solución de tampón recibida en la segunda localización 1124 de modo que parte de la solución de tampón se dirija al primer material absorbente 1432a, 1432b que dirige la muestra, y parte de la solución de tampón se dirija al tercer material absorbente o secante 1430A (seleccionado para que tenga una característica de flujo más lento que el primer material absorbente 1432a, 1432b o el segundo o cuarto material absorbente 1430a, 1430b). En la realización de la figura 5, el tercer material absorbente 1430A está dispuesto como una "T", aunque el material podría formarse en otras formas (tal como una "V", una "M", o una raya, a modo de ejemplo solamente). Independientemente, el tercer material absorbente 1430A está en contacto con el segundo material absorbente 1430a, 1430b (mostrado como dos trozos diferentes en la figura 5 - aunque dependiendo de la disposición del tercer material absorbente, el segundo material absorbente podría ser un único trozo tal como en la forma de un corchete (|), una "E", a modo de ejemplo solamente). Esto proporciona dos trayectorias alargadas 1462a, 1462b para las respectivas zonas de ensayo 1433a, 1433b que están localizadas respectivamente en la unión del segundo material absorbente 1430a con el primer material absorbente 1432a, y la unión del segundo material absorbente 1430b con el primer material absorbente 1432b. Las zonas de ensayo 1433a, 1433b incluyen una o más líneas de ensayo o indicadores (por ejemplo, 1450A, 1450B) que tienen antígenos o

anticuerpos inmovilizados en el material absorbente 1430a, 1430b o el material absorbente 1432a, 1432b. Preferiblemente, las líneas de control 1460a, 1460b se proporcionan posteriores a las líneas de ensayo, y puede proporcionarse también un depósito opcional o zona de mecha 1437a, 1437b. El conjugado 1439a, 1439b que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores coloreados adheridos se inmoviliza a lo largo de las trayectorias alargadas 1462a, 1462b preferiblemente en o sobre el segundo material absorbente 1430a, 1430b anterior a las zonas de ensayo 1433a, 1433b. Como se muestra en la figura 5, las zonas de conjugado están localizadas preferiblemente hacia los extremos de la zona de ensayo de las trayectorias alargadas. Con la disposición proporcionada, si primero se deposita la muestra en la primera localización 1426, y después se deposita el tampón en la segunda localización 1424, el tampón causará que la muestra alcance las zonas de ensayo 1433a, 1433b a través de las trayectorias 1461a, 1461b y permitirá que los antígenos y/o anticuerpos en la muestra se unan a los anticuerpos y/o antígenos en las líneas de ensayo 1450A, 1450B antes de que el conjugado 1439a, 1439b se transporte por el tampón que alcanza la zona de ensayo a través de las trayectorias alargadas 1462a, 1462b.

En la cuarta y quinta realización, el tercer material absorbente o secante que tiene una característica de flujo más lento respecto al primer material absorbente puede ser una membrana de poro pequeño (por ejemplo, membrana de nitrocelulosa o nailon que tiene un tamaño de poro de 3 a 30 micrómetros), fibras de vidrio, o celulosa, poliéster, rayón u otros materiales sintéticos conocidos. Como apreciarán los expertos en la materia, podrían utilizarse otros materiales para controlar la velocidad del flujo de tampón a través del tercer material absorbente y controlar de ese modo el ritmo de llegada del tampón con el conjugado en el sitio de ensayo respecto a la llegada de la muestra.

Una sexta realización de un sistema de dispositivo de inmunoensayo de doble trayectoria de conjugado seco 1500 se observa en la figura 6 y también proporciona un dispositivo de inmunoensayo de cuarta generación. La sexta realización es similar a la quinta realización excepto en que en lugar de proporcionar un tercer material absorbente que tiene características de flujo más lento, las trayectorias alargadas para el tampón que finalmente transporta el conjugado son tortuosas o sinuosas, y son al menos cinco veces la longitud de la trayectoria de flujo de la muestra. Más particularmente, el sistema 1500 incluye una celda de ensayo 1510 con una primera localización 1526 para recibir una muestra y una segunda localización 1524 para recibir una solución de tampón. Se proporciona un primer material absorbente o secante con ramificaciones 1532a, 1532b para dirigir las trayectorias de flujo horizontal 1561a, 1561b para la muestra. El primer material absorbente puede estar hecho de un único trozo de material o múltiples trozos de material. El medio analizado a continuación con referencia a las figuras 7-9b se proporciona para dividir la solución de tampón recibida en la segunda localización 1524 de modo que parte de la solución de tampón se dirija al primer material absorbente 1532a, 1532b que dirige la muestra, y parte de la solución de tampón se dirija al segundo material absorbente o secante 1530a, 1530b que proporciona dos ramificaciones de la trayectoria alargada 1562a, 1562b hasta las zonas de ensayo respectivas 1533a, 1533b que están localizadas respectivamente en la unión de una primera ramificación del segundo material absorbente 1530a con una primera ramificación del primer material absorbente 1532a, y la unión de la segunda ramificación del segundo material absorbente 1530b con una segunda ramificación del primer material absorbente 1532b. Las zonas de ensayo 1533a, 1533b incluyen una o más líneas de ensayo o indicadores (por ejemplo, 1550A, 1550B) que tienen antígenos o anticuerpos inmovilizados en el material absorbente 1530a, 1530b o el material absorbente 1532a, 1532b. Preferiblemente, las líneas de control 1560a, 1560b se proporcionan posteriores a las líneas de ensayo, y puede proporcionarse también un depósito opcional o zona de mecha 1537a, 1537b. El conjugado 1539a, 1539b que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores coloreados adheridos se inmoviliza a lo largo de las trayectorias alargadas 1562a, 1562b preferiblemente en o sobre el segundo material absorbente 1530a, 1530b anterior a las zonas de ensayo 1533a, 1533b. Como se muestra en la figura 6, las zonas de conjugado están localizadas preferiblemente hacia los extremos de la zona de ensayo de las trayectorias alargadas. Con la disposición proporcionada, si primero se deposita la muestra en la primera localización 1526, y después se deposita el tampón en la segunda localización 1524, el tampón causará que la muestra alcance las zonas de ensayo 1533a, 1533b a través de las trayectorias 1561a, 1561b y permitirá que los antígenos y/o anticuerpos en la muestra se unan a los anticuerpos y/o antígenos en las líneas de ensayo 1550A, 1550B antes de que el conjugado 1539a, 1539b se transporte por el tampón que alcanza la zona de ensayo a través de las trayectorias alargadas 1562a, 1562b.

En todas las realizaciones previas, cuando se proporciona el dispositivo de ensayo de la invención en una carcasa, la carcasa está provista de una primera abertura adyacente a la primera localización y una segunda abertura adyacente a la localización que recibe el tampón. Se proporciona una ventana de visualización en la carcasa por encima de la línea de ensayo. Cuando se proporciona una línea de control, la ventana de visualización puede ampliarse sobre la línea de ensayo y la línea de control, o puede proporcionarse una ventana de visualización diferente sobre la línea de control.

En todas las realizaciones previas, se prefiere que las localizaciones para recibir la muestra y la solución de tampón se proporcionen cerca o adyacentes una de la otra.

Volviendo ahora a las figuras 7-9a, se proporcionan diversos divisores que dividen la solución de tampón recibida en la localización que recibe el tampón. Se observa un primer divisor para la solución de tampón en la figura 7 y comprende un elemento con forma de cuña 1601 (con forma de V o de sección transversal triangular) localizado en la localización para recibir la solución de tampón (por ejemplo, en una abertura en una carcasa), donde el ápice 1602 de la cuña está dirigido hacia arriba. A medida que gotean las gotas de solución de tampón en la abertura que recibe el tampón, el ápice divide las gotas en dos corrientes.

La primera corriente está dirigida al primer material absorbente. La segunda corriente está dirigida al segundo material absorbente de la trayectoria alargada. Si el ápice de la cuña está localizado en el centro de la localización que recibe el tampón, la mitad de la solución de tampón estará dirigida hacia la localización que recibe la muestra y el primer material absorbente, y la otra mitad estará dirigida hacia el segundo material absorbente. Si el ápice de la cuña está localizado en un lado o el otro, puede dirigirse una mayor cantidad del tampón a un lado o al otro.

Se muestra un segundo divisor para la solución de tampón recibida en la localización que recibe el tampón en la figura 8 y comprende un material de control de flujo 1601a. El material de control de flujo 1601a se elige para que permita que el tampón fluya, pero es resistente a la recepción de la muestra. Un ejemplo sería un material de tamaño de poro muy pequeño tal como algodón o papel de celulosa (preferiblemente con poros de menos de 3 micrómetros). El material de control de flujo 1601a está acoplado tanto a la localización que recibe la muestra (por ejemplo, almohadilla) como al segundo (o tercer) material absorbente.

Se muestra un tercer divisor 1601b para la solución de tampón recibida en la localización que recibe el tampón en las figuras 9 y 9a y comprende una abertura 1603 en una carcasa 1604 con el tamaño adecuado para recibir la punta 1605 de un distribuidor de tampón, y una pared vertical 1606 rebajada en la abertura de la carcasa que divide la solución de tampón. Preferiblemente, la localización que recibe la muestra o almohadilla se proporciona en un lado de la pared vertical, y el segundo (o tercer) material absorbente se proporciona en el otro lado de la pared vertical. Se apreciará que la pared 1606 puede adoptar cualquier forma deseada siempre que esté localizada apropiadamente para dividir las gotas de tampón que se está suministrando por la punta del distribuidor de tampón. Por tanto, la pared puede dividir la solución de tampón de modo que aproximadamente la mitad de la solución de tampón se dirija hacia el primer material absorbente y la otra mitad de la solución de tampón se dirija hacia el segundo material absorbente, o puede dividir la solución de tampón de modo que una primera proporción deseada de la solución de tampón se dirija hacia el primer material absorbente y una segunda proporción diferente deseada de la solución de tampón se dirija hacia el segundo material absorbente.

Con respecto a todas las realizaciones anteriores de celdas de ensayo y realizaciones de divisores de tampón, de acuerdo con la invención, el tampón se empaqueta como parte de la celda de ensayo proporcionando un "botón de tampón" 1780 que se observa en la figura 10 en la segunda localización. Por ejemplo, si se proporciona una carcasa, el botón de tampón puede constituir un módulo localizado en una abertura de la carcasa por encima de la segunda localización. El módulo podría constituir una membrana superior de plástico flexible 1781 y un miembro inferior rompible (por ejemplo, papel de aluminio o plástico) 1782, con la solución de tampón 1783 contenida entre las mismas.

Como resultado, cuando el miembro superior de plástico flexible se presiona, la fuerza se traslada a la solución de tampón que causa que el miembro inferior se rompa y libere la solución de tampón que después se divide por el medio divisor del tampón. Como alternativa, contenido dentro del módulo puede haber un elemento divisor (por ejemplo, un elemento de plástico vertical conectado al miembro superior de plástico flexible) que causa que el recipiente inferior se rompa y que divida automáticamente la solución de tampón contenida dentro del módulo sin la necesidad de un medio diferente para dividir la solución de tampón. Como otra alternativa, una cuña (tal como la cuña 1600) o una pared (tal como la pared 1606) contenida dentro de la carcasa por debajo del botón de tampón puede usarse para romper la membrana inferior cuando se presiona el botón de tampón.

De acuerdo con un aspecto de la invención, cualquiera de los dispositivos de ensayo descritos anteriormente puede usarse

- (1) depositando una muestra en la localización que recibe la muestra,
- (2) depositando una cantidad predeterminada de solución de tampón en la localización que recibe el tampón, y
- (3) después de un periodo de tiempo deseado, inspeccionando la zona o zonas de ensayo y, cuando se proporcionan la zona o zonas de control, para determinar si el ensayo es positivo o negativo.

Se aprecia que se deposita suficiente tampón en la localización que recibe el tampón para causar que la muestra se mueva a lo largo del primer material absorbente hasta la zona de ensayo, así como para atravesar la trayectoria del segundo (y cuando se proporciona, el tercero) material absorbente y causar que el conjugado se mueva hasta la zona de ensayo. A causa de la disposición del primer material absorbente, así como el segundo (y cuando se proporciona, el tercero) material absorbente, la muestra se lleva a la zona de ensayo antes que el conjugado. La etapa de depósito de una muestra puede implicar el depósito de sangre, suero, esputo, heces u otro fluido corporal en la primera localización a través de un cuentagotas, un hisopo, un asa u otro medio de depósito conocido en la técnica. La etapa de depósito de una cantidad predeterminada de solución de tampón puede comprender utilizar un cuentagotas, presionar un botón de tampón o utilizar cualquier otro medio de depósito conocido en la técnica.

Se apreciará que los materiales, grosores y longitudes del primer y segundo material absorbente se eligen para ajustar la cronología respecto a la muestra y el conjugado que alcanzan el sitio o sitios de ensayo.

Se han descrito e ilustrado en este documento varias realizaciones de inmunoensayos y métodos de su uso. Aunque se han descrito realizaciones particulares de la invención, no se pretende que la invención se limite a las mismas.

5 Por ejemplo, aunque la memoria descriptiva analiza la unión de ligando usando reacciones de antígeno/anticuerpo, también pueden usarse otros mecanismos de unión de ligando tales como unión de aptámero, unión de ácido nucleico, unión enzimática, etc. Además, aunque se han descrito divisores de tampón particulares que dividen el tampón para la trayectoria de flujo de muestra y la trayectoria de flujo de conjugado, se apreciará que podrían utilizarse otros divisores. Además, debe apreciarse que pueden añadirse agentes químicos tales como azúcar, BSA, detergente, etc., o agentes biológicos (suero, anticuerpo, antígeno) en una o ambas tiras absorbentes para retardar o potenciar el caudal del tampón o la solución de tampón/muestra. Estas modificaciones podrían utilizarse adicionalmente para potenciar la sensibilidad o bloquear la unión no específica para el ensayo. Por lo tanto, los expertos en la materia apreciarán que podrían hacerse otras modificaciones más a la invención proporcionada sin desviarse de su alcance reivindicado.

10

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ensayo de inmunoensayo para determinar la presencia de un ligando en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo de ensayo
- 5 a) una solución de tampón (1783)
 b) una primera tira absorbente (1032; 1132; 1232a, 1232b; 1332; 1432a, 1432b) que tiene una localización que recibe la muestra (1026; 1126; 1226a, 1226b; 1326; 1426), definiendo la tira una primera trayectoria de migración (1061; 1161; 1261a, 1261b; 1361; 1461a, 1461b);
 10 c) una segunda tira absorbente (1030; 1130; 1230a, 1230b; 1330; 1430a, 1430b) distinta de dicha primera tira absorbente, teniendo dicha segunda tira absorbente una localización que recibe el tampón (1024; 1124; 1224a, 1224b; 1324; 1424), y definiendo al menos parcialmente la tira una segunda trayectoria de migración (1062; 1162; 1262a, 1262b; 1362; 1462a, 1462b) distinta de dicha primera trayectoria de migración y alargada respecto a dicha primera trayectoria de migración;
 15 d) un conjugado (1039; 1139; 1239a, 1239b; 1339; 1439a, 1439b) mantenido por dicha tira segunda tira absorbente;
 e) un sitio de ensayo (1033; 1333; 1233a, 1233b; 1333; 1433a, 1433b) localizado sobre, o en al menos, una de dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente, teniendo dicho sitio de ensayo un mecanismo de unión a ligando inmovilizado, y tocándose dicha primera y segunda tiras absorbentes entre sí en el sitio de
 20 ensayo; en el que dicha primera trayectoria de migración tiene una primera longitud y dicha segunda trayectoria de migración tiene una segunda longitud, permitiendo dicha primera longitud y dicha segunda longitud que la muestra alcance dicho sitio de ensayo de modo que el ligando en dicha muestra alcance dicho sitio de ensayo y se una a dicho mecanismo de unión a ligando inmovilizado antes de que dicho conjugado alcance dicho sitio de ensayo;
- 25 caracterizado porque el dispositivo de ensayo comprende adicionalmente
- f) un recipiente quebradizo (1782) que contiene dicha solución de tampón; y
 g) un divisor (1601, 1601a, 1601b) en la localización que recibe el tampón, estando dispuesto dicho divisor de modo que cuando el recipiente quebradizo se rompe, el divisor dividirá la solución de tampón en una primera
 30 cantidad y una segunda cantidad, dirigiendo la primera cantidad de dicha solución de tampón desde dicha localización que recibe el tampón hasta dicha primera tira absorbente para mover dicha muestra a dicho sitio de ensayo, y dirigiendo la segunda cantidad de dicha solución de tampón desde dicha localización que recibe el tampón hasta dicha segunda tira absorbente para mover dicho conjugado hasta dicho sitio de ensayo.
- 35 2. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una carcasa que define una primera abertura adyacente a dicha localización que recibe la muestra, una segunda abertura adyacente a dicha localización que recibe el tampón y una ventana adyacente a dicho sitio de ensayo a través de la cual puede visualizarse dicho sitio de ensayo.
- 40 3. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha segunda trayectoria de migración es tortuosa y opcionalmente al menos cuatro veces tan larga como dicha primera trayectoria de migración, y/o en el que dicha segunda tira absorbente incluye un elemento de retardo.
- 45 4. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
- una tercera tira absorbente (1330a) distinta de dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente, acoplado dicha tercera tira absorbente dicha localización que recibe el tampón a dicha segunda tira absorbente, teniendo dicha tercera tira absorbente características de flujo más lento que dicha primera tira absorbente.
- 50 5. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho conjugado comprende un antígeno o anticuerpo para el ligando y un marcador acoplado al antígeno o anticuerpo, comprendiendo opcionalmente dicho marcador un marcador coloreado que puede visualizarse en el espectro visible.
- 55 6. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una de dicha primera y segunda tira absorbente incluye un sitio de control (1060; 1160; 1260a, 1260b; 1360; 1460a, 1460b).
7. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha primera tira absorbente tiene un primer tamaño de poro (tal como de 2 a 20 micrómetros) y dicha segunda tira absorbente tiene un segundo tamaño de poro (tal como de 20 a 40 micrómetros) más grande que dicho primer tamaño de poro.
- 60 8. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en el que dicho divisor comprende una cuña (1601) o una pared (1606).

9. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en el que dicha localización que recibe el tampón (1024; 1124; 1224a, 1224b, 1324) está adyacente a dicha localización que recibe la muestra (1026; 1126; 1226a, 1226b; 1326).

5 10. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en el que dicho recipiente quebradizo (1782) incluye dicho divisor.

11. Un dispositivo de ensayo de inmunoensayo para determinar la presencia de un ligando en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo de ensayo para su uso con una solución de tampón:

10 a) un primer material absorbente o secante (1432a, 1532a) que tiene una localización que recibe la muestra (1426, 1526), definiendo el primer material una primera trayectoria de migración horizontal (1461a, 1561a) para la muestra;

15 b) un segundo material absorbente o secante (1432b, 1532b) en contacto fluido con dicha primera localización y que define una segunda trayectoria de migración horizontal (1461b, 1561b) para la muestra;

c) un tercer material absorbente o secante (1430a, 1530a) distinto de dicho primer y segundo materiales absorbentes o secantes, teniendo dicho tercer material absorbente o secante una localización que recibe el tampón (1424, 1524), y definiendo al menos parcialmente una tercera trayectoria de migración horizontal (1462a, 1562a) distinta de dicha primera y segunda trayectoria de migración y alargada respecto a dicha primera y segunda trayectorias de migración;

20 d) un primer conjugado (1439a, 1539a) mantenido por dicho tercer material absorbente o secante;

25 e) un cuarto material absorbente o secante (1430b, 1530b) distinto de dicho primer y segundo materiales absorbentes o secantes, estando dispuesto dicho cuarto material absorbente o secante para recibir parte de la solución de tampón desde dicha localización que recibe el tampón y para definir al menos parcialmente una cuarta trayectoria de migración horizontal (1462b, 1562b) distinta de dicha primera y segunda trayectorias de migración y alargada respecto a dicha primera y segunda trayectorias de migración;

f) un segundo conjugado (1439b, 1539b) mantenido por dicho cuarto material absorbente o secante;

30 g) un primer sitio de ensayo (1450A, 1550A) localizado sobre, o en al menos, uno de dicho primer material absorbente o secante y dicho tercer material absorbente o secante, teniendo dicho primer sitio de ensayo un primer mecanismo de unión a ligando inmovilizado para detectar anticuerpos en la muestra, y tocándose dicho primer y tercer materiales absorbentes o secantes entre sí en dicho primer sitio de ensayo;

35 h) un segundo sitio de ensayo (1450B, 1550B) localizado sobre, o en al menos, uno de dicho segundo material absorbente o secante y dicho cuarto material absorbente o secante, teniendo dicho segundo sitio de ensayo un segundo mecanismo de unión a ligando inmovilizado para detectar antígenos en la muestra, tocándose dicho segundo y cuarto materiales absorbentes o secantes entre sí en dicho segundo sitio de ensayo; y

40 i) un divisor (1601, 1601a, 1601b) en dicha localización que recibe el tampón que divide la solución de tampón en una primera cantidad y una segunda cantidad, estando dirigida la primera cantidad desde la localización que recibe el tampón hasta dicho primer y segundo materiales absorbentes o secantes para mover dicha muestra hasta dicho primer y segundo sitios de ensayo, y estando dirigida la segunda cantidad desde la localización que recibe el tampón hasta dicho tercer y cuarto materiales absorbentes o secantes para mover dicho primer y segundo conjugados hasta dicho primer y segundo sitio de ensayo,

45 en el que dicha primera trayectoria de migración tiene una primera longitud, dicha segunda trayectoria de migración tiene una segunda longitud, dicha tercera trayectoria de migración tiene una tercer longitud, y dicha cuarta trayectoria de migración tiene una cuarta longitud, y dicha primera longitud y dicha tercera longitudes se eligen para permitir que dicha muestra alcance dicho primer sitio de ensayo de modo que el ligando en dicha muestra alcance dicho primer sitio de ensayo y se una a dicho primer mecanismo de unión a ligando inmovilizado antes de que dicho primer conjugado alcance dicho primer sitio de ensayo, y dicha segunda longitud y dicha cuarta longitud se elijan para permitir que dicha muestra alcance dicho segundo sitio de ensayo de modo que el ligando en dicha muestra alcance dicho segundo sitio de ensayo y se una a dicho segundo mecanismo de unión a ligando inmovilizado antes de que dicho segundo conjugado alcance dicho segundo sitio de ensayo.

12. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende adicionalmente:

55 un quinto material absorbente o secante (1430A) distinto de dicho primer, segundo, tercer y cuarto materiales absorbentes o secantes, acoplado dicho quinto material absorbente o secante dicha segunda localización a dicho tercer material absorbente o secante, teniendo dicho quinto material absorbente o secante características de flujo más lento que dicho segundo material absorbente o secante.

60 13. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende adicionalmente:

65 un sexto material absorbente o secante distinto de dicha primera, segunda, tercera y cuarta tiras absorbentes o secantes, acoplado dicho sexto material absorbente o secante dicha segunda localización a dicha tercera tira absorbente o secante, teniendo dicho quinto material absorbente o secante características de flujo más lento que dicho segundo material absorbente o secante, teniendo opcionalmente dicho quinto y sexto materiales absorbentes o secantes partes que no son distintas entre sí.

14. Un método para ensayar una muestra para la presencia de un ligando, que comprende:

a) obtener un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquier reivindicación previa;

b) aplicar la muestra a dicha localización que recibe la muestra;

5 c) después de la etapa b), aplicar la solución de tampón a la localización que recibe el tampón; y

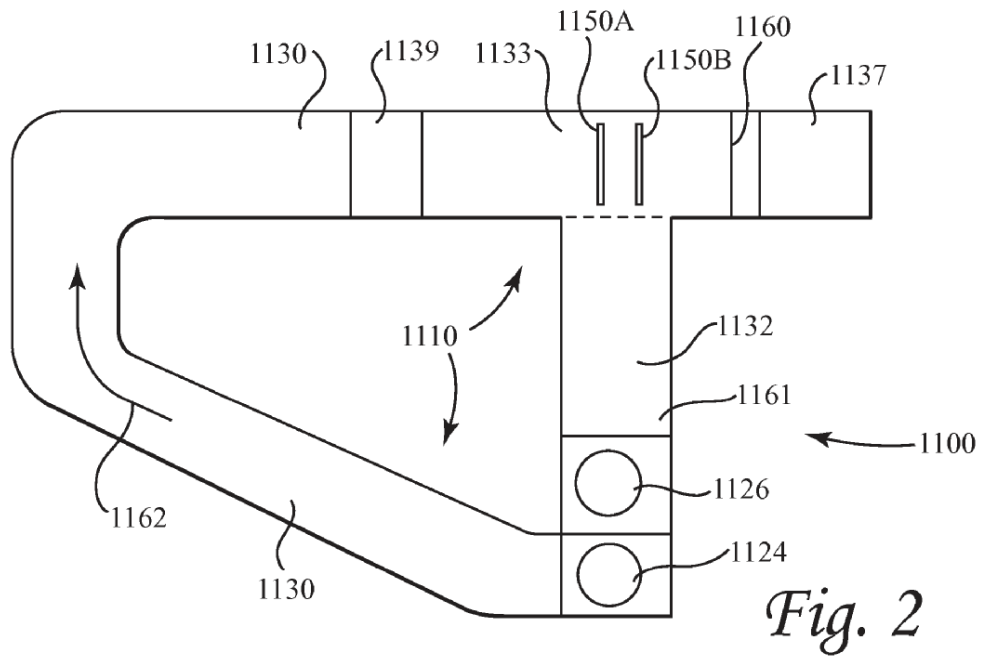
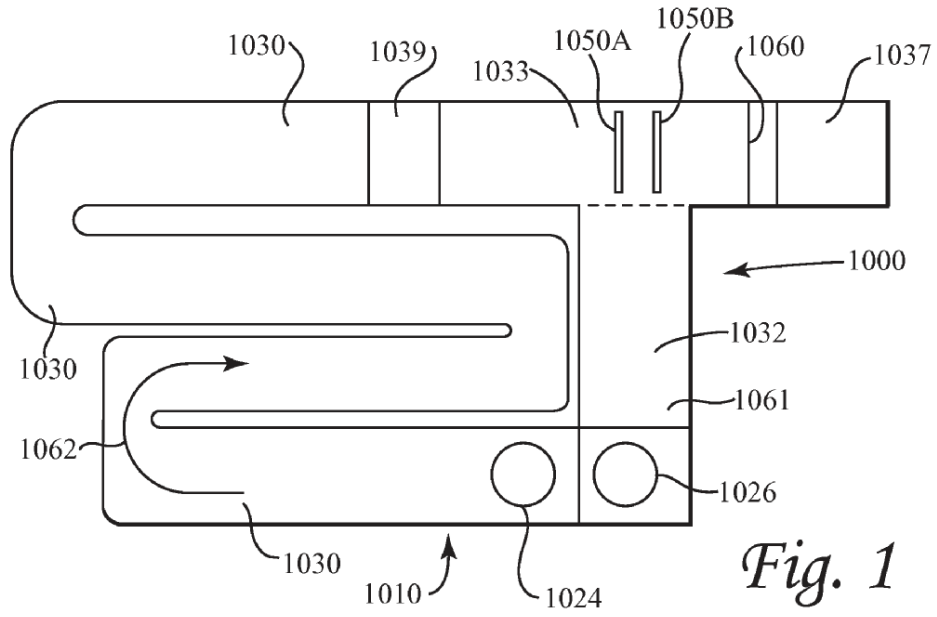
d) inspeccionar dicho sitio de ensayo o sitios de ensayo para determinar una indicación de la presencia o ausencia del ligando en la muestra.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que:

10 dicho dispositivo de ensayo tiene una carcasa que define una primera abertura adyacente a dicha localización que recibe la muestra, una segunda abertura adyacente a dicha localización que recibe el tampón, y una ventana adyacente a cada dicho sitio de ensayo a través de la cual puede visualizarse el sitio de ensayo respectivo,

15 dicha aplicación de la muestra comprende depositar la muestra a través de dicha primera abertura hasta dicha localización que recibe la muestra,

dicha aplicación de la solución de tampón comprende depositar la solución de tampón a través de dicha segunda abertura hasta dicha localización que recibe el tampón, y dicha inspección es a través de cada una de dichas ventanas.



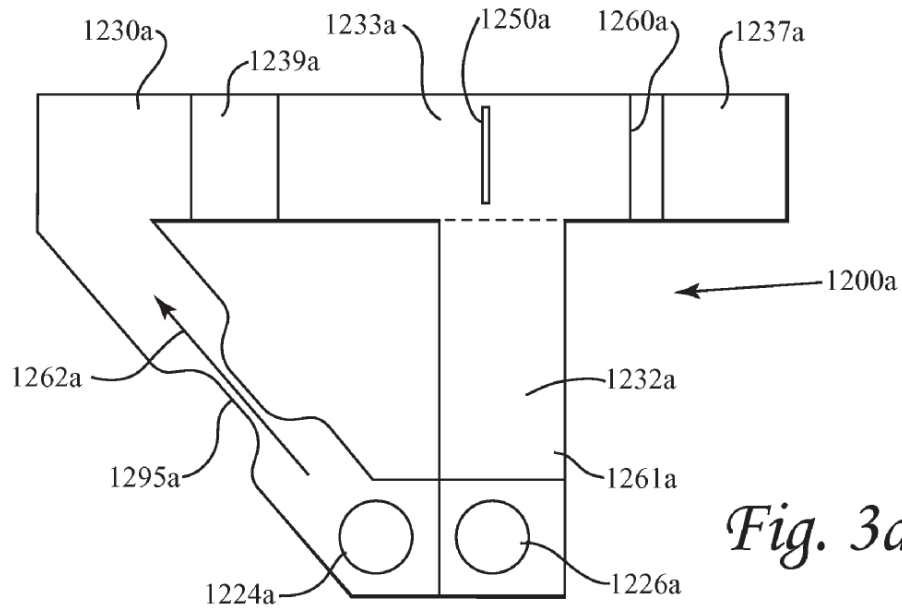


Fig. 3a

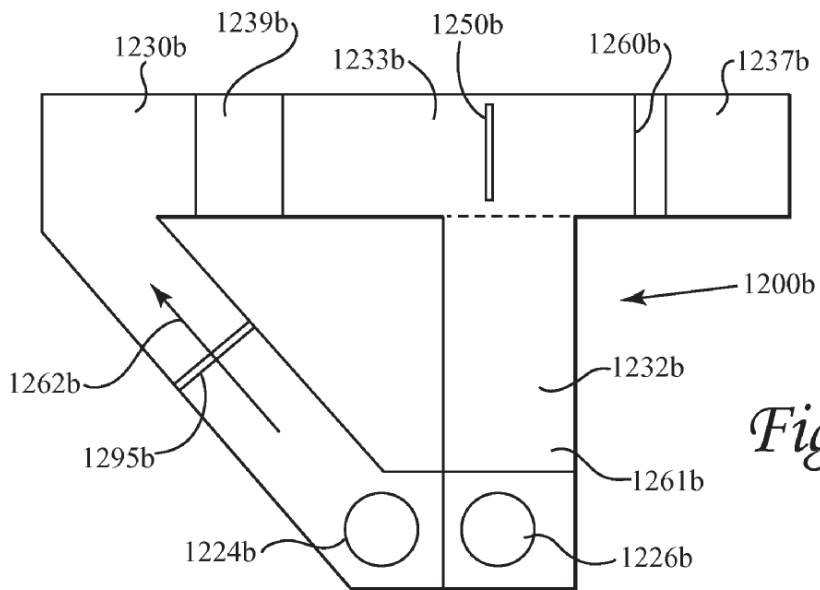
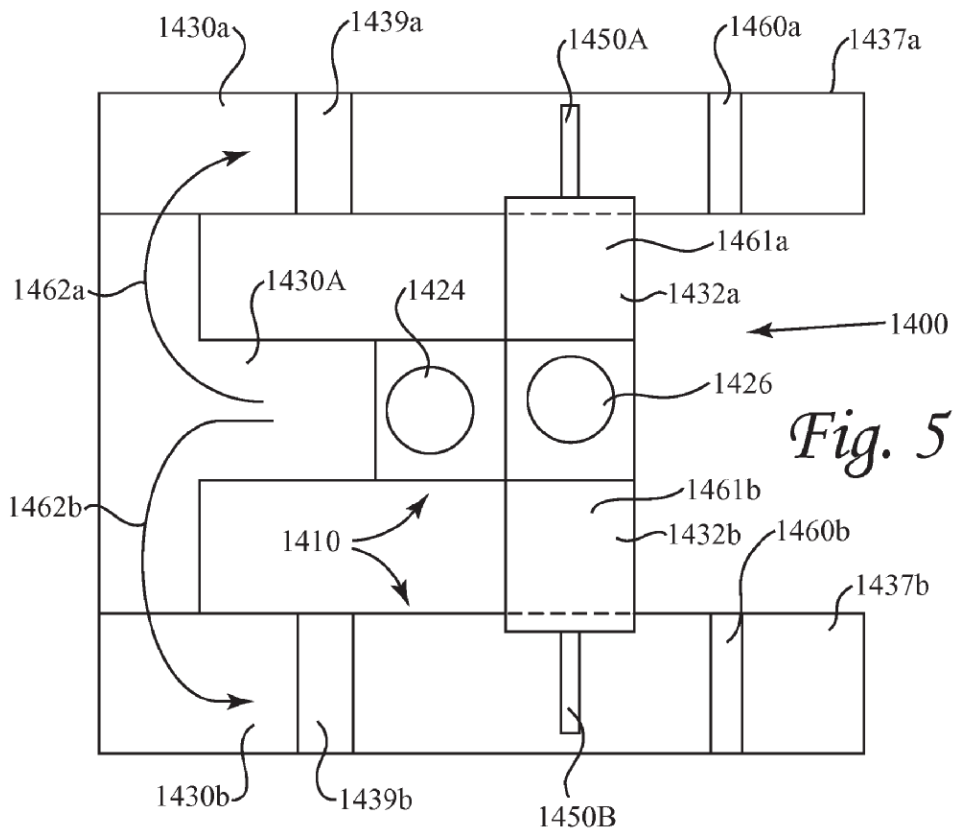
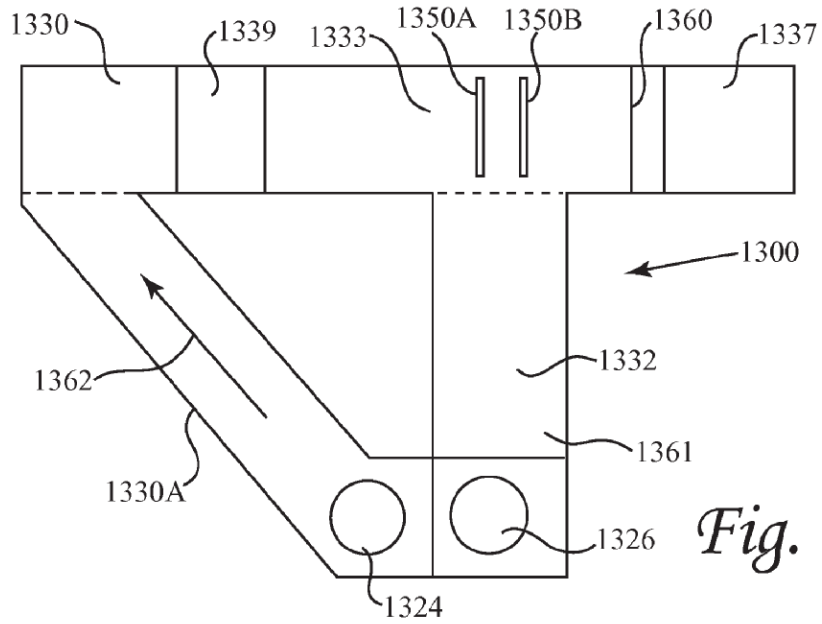


Fig. 3b



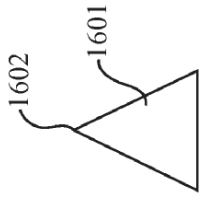


Fig. 7

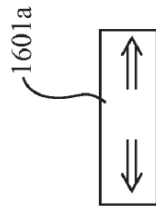


Fig. 8

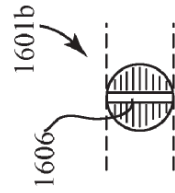


Fig. 9

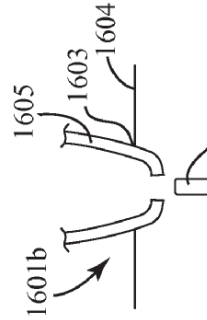


Fig. 9a

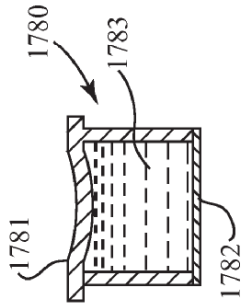


Fig. 10

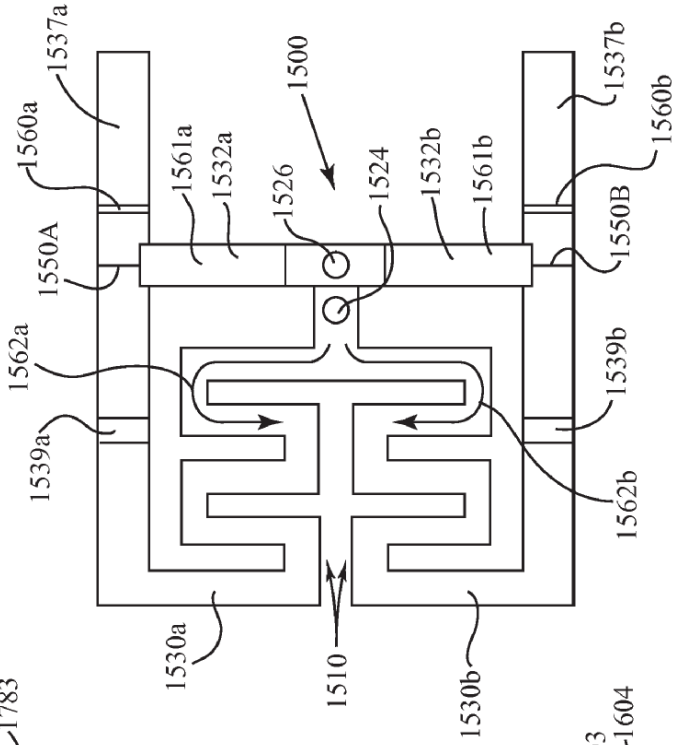


Fig. 6