

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 350**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2009 PCT/US2009/057775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10033963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2009 E 09815363 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2335072**

54 Título: **Método y dispositivo para la detección combinada de infecciones virales y bacterianas**

30 Prioridad:

**22.09.2008 US 98935 P**  
**18.05.2009 US 179059 P**  
**14.07.2009 US 502662**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.05.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 666 350 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**

Método y dispositivo para la detección combinada de infecciones virales y bacterianas

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al campo de los inmunoensayos de flujo lateral. Más particularmente, la invención se refiere a un inmunoensayo de flujo lateral que detecta rápidamente infección viral y bacteriana.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 La fiebre es una causa frecuente de visitas de infantes a centros de atención urgente tanto para consultorios de medicina familiar como pediátricos. Más comúnmente, se relaciona con una infección respiratoria o gastroenteritis. La alta incidencia de fiebre en los niños y la administración como precaución de antibióticos innecesarios es una razón para desarrollar una prueba de detección rápida de los biomarcadores que indican una infección viral y/o bacteriana.

- 15 A menudo es difícil diferenciar las infecciones virales de las bacterianas. Esto es especialmente cierto en niños pequeños que no pueden verbalizar sus síntomas y en el entorno ambulatorio donde el acceso a diagnósticos de laboratorio es costoso, lento y requiere varios días para producir un resultado. Más recientemente, se han identificado muchos nuevos marcadores de diagnóstico. Varios de estos marcadores se muestran muy prometedores para diferenciar las infecciones virales de las bacterianas. Dos de tales proteínas incluyen MxA y Proteína C-Reactiva (CRP). La mayoría de las infecciones respiratorias están relacionadas con la faringitis, de la cual el 40% es causada por virus y el 25-50% por el estreptococo beta hemolítico del grupo A. Las causas menores son la bronquiolitis aguda y la neumonía.

- 20 La neumonía severa adquirida en la comunidad es causada por infecciones bacterianas en alrededor del 60% de los casos, que requiere el ingreso a una unidad de cuidados intensivos (UCI) para aproximadamente el 10% de los pacientes. El 30% restante está relacionado con virus respiratorios.

- 25 Aproximadamente el 80% de todos los antimicrobianos se prescriben en atención primaria, y hasta el 80% de estos son para indicaciones de vías respiratorias. Las infecciones del tracto respiratorio son de lejos, la causa más común de tos en la atención primaria. Los antibióticos de amplio espectro a menudo se prescriben para la tos, incluida la bronquitis aguda, y muchas de estas prescripciones solo beneficiarán a los pacientes de forma marginal, si es que lo hacen, y pueden causar efectos secundarios y promover resistencia a los antibióticos. Los factores que instan a los médicos a administrar antibióticos incluyen la ausencia de un marcador diagnóstico adecuado de infecciones bacterianas, la preocupación por la falta de seguimiento del paciente y la presión del tiempo.

- 30 Las proteínas Mx son miembros de la superfamilia de GTPasas de alto peso molecular. Por consiguiente, estas GTPasas son reguladas positivamente por interferones de tipo I alfa/beta o tipo II (IFN). Las Mx GTPasas se expresan exclusivamente en células IFN alfa/beta pero no en las tratadas con IFN gamma. Los interferones tipo I desempeñan papeles importantes en las respuestas inmunes innatas y tienen funciones inmunomoduladoras, antiproliferativas y antivirales. La MxA humana, una proteína de 78 kDa, se acumula en el citoplasma de células tratadas con IFN e inhibe la replicación de una amplia gama de virus. La proteína MxA puede ofrecer ciertas ventajas como marcador de infección viral sobre las otras proteínas inducidas, como la 2',5'-oligoadenilato sintetasa, debido a su menor concentración basal, su vida media más larga (2.3 días) y su rápida inducción. El ARNm de MxA es detectable en glóbulos blancos de sangre periférica aislados estimulados con IFN dentro de 1 a 2 h de inducción de IFN, y la proteína MxA comienza a acumularse poco después.

- 40 Los estudios han demostrado que la expresión de la proteína MxA en sangre periférica es un marcador sensible y específico para la infección viral. Los niveles más altos de MxA en el grupo de infección viral en comparación con el grupo de infección bacteriana se pueden explicar por el hecho de que la proteína MxA es inducida exclusivamente por IFN de tipo I y no por IFN-gamma, IL-1, TNF-alfa o cualquiera de las otras citoquinas por infección bacteriana. Los niveles de IFN tipo I en suero se mantienen dentro de los límites normales, incluso en pacientes con infecciones bacterianas graves.

- 45 De forma similar, se ha informado que la mayoría de las infecciones víricas causan poca respuesta de fase aguda, y se han usado concentraciones bajas de proteína C-reactiva (CRP) para distinguir enfermedades de origen viral de las de etiología bacteriana. Debido a que la concentración plasmática de CRP aumenta rápidamente después de la estimulación y disminuye rápidamente con una vida media corta, la CRP puede ser una herramienta muy útil para diagnosticar y controlar infecciones y enfermedades inflamatorias. En Escandinavia, las pruebas de detección de CRP en el punto de atención son parte de la evaluación de rutina de los pacientes con infecciones respiratorias en la práctica general, y su uso ha demostrado ser rentable. En la práctica general, la CRP se encuentra valiosa en el diagnóstico

de enfermedades bacterianas y en la diferenciación entre infecciones bacterianas y virales. A menudo, el valor diagnóstico de CRP se encuentra superior al de la tasa de sedimentación globular (ESR) y superior o igual al del recuento de glóbulos blancos (WBC).

5 Clínicamente, puede ser un desafío diferenciar ciertas infecciones virales y bacterianas sistémicas. Los cultivos bacterianos generalmente se realizan en casos de infección grave, como neumonía, o cuando la consecuencia de perder un diagnóstico puede provocar complicaciones graves, como con la faringitis estreptocócica. Muchas veces, los cultivos son difíciles de obtener. Desafortunadamente, los cultivos virales no se realizan rutinariamente debido a un retraso significativo en la recepción de los resultados. Los nuevos paneles CRP de cribado viral son útiles, pero son caros y no proporcionan información en el punto de atención. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una prueba de diagnóstico simple y fácil de usar que sea capaz de diferenciar infecciones virales y bacterianas.

15 La publicación de Patente WO 01/36975 (Binax, Inc., publicada el 25 de mayo de 2001) describe un método para determinar y diagnosticar la enfermedad entérica inflamatoria usando un dispositivo de prueba inmunocromatográfico con una pluralidad de zonas de prueba. Esta publicación divulga el uso de un cóctel de diversos anticuerpos para causas comunes de infección. Cada uno de los anticuerpos es específico para un patógeno bacteriano o viral específico.

El documento EP 1489416 (Kyowa Medex Co., Ltd., publicado el 22 de diciembre de 2004) describe métodos y kits para detectar infección bacteriana usando CRP e infección viral usando MxA. CRP y MxA se detectan en diferentes dispositivos.

20 Leung et al. (Journal of Immunological Methods, 336, 2008, pp. 30-36) describe un ensayo de flujo lateral tipo código de barras para la detección de CRP.

#### Resumen de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra los resultados de la prueba visual de la ventana de prueba de criba rápida para distinguir las infecciones virales y bacterianas y una interpretación de esos resultados.

La Figura 2 muestra tres casetes con diferentes líneas de prueba de color.

La Figura 3 muestra una comparación de un detector de dos líneas, donde ambas líneas son del mismo color, y un detector de dos líneas extremadamente sensible, donde las dos líneas son de colores diferentes.

30 La Figura 4A muestra un dispositivo con una línea de prueba que corresponde a la presencia de un marcador viral y una segunda línea de prueba separada que detecta la presencia de un marcador bacteriano en una realización de la presente invención.

La Figura 4B muestra un dispositivo con una línea de prueba que corresponde a la presencia de un marcador viral y una segunda línea de prueba separada que detecta la presencia de un marcador bacteriano en otra realización de la presente invención.

35 La Figura 5A muestra un dispositivo de análisis de muestra que incluye una zona de lisis situada entre una zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo en una realización de la presente invención.

La Figura 5B muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que se superpone a una zona de aplicación de muestra en una realización de la presente invención.

40 La Figura 5C muestra un dispositivo de análisis de muestra que incluye una zona de lisis que se solapa con una zona de reactivo en una realización de la presente invención.

La Figura 5D muestra un dispositivo de análisis de muestra que incluye una zona de lisis que solapa una zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo en una realización de la presente invención.

#### Descripción detallada de la invención

45 La presente divulgación proporciona un ensayo de flujo lateral que es capaz de diferenciar infecciones virales y bacterianas. Un dispositivo de diagnóstico combinado de puntos de atención prueba los marcadores de infección viral

5 y bacteriana y puede ayudar eficazmente a la rápida diferenciación de infecciones virales y bacterianas, por ejemplo, en la consulta externa o durante una visita de atención urgente. Esta capacidad puede reducir drásticamente los costes de atención médica al limitar el diagnóstico erróneo y el uso excesivo posterior de antibióticos. Tal práctica puede limitar las alergias a los antibióticos, los eventos adversos y la resistencia a los antibióticos. El resultado rápido obtenido de la prueba también permite un diagnóstico mientras el paciente todavía está siendo examinado por el médico. En una realización preferida, el resultado de la prueba se obtiene en menos de 10 minutos después de aplicar la muestra al dispositivo, y se lee preferiblemente en aproximadamente 10 minutos. En muestras que son altamente positivas, la línea de prueba es visible al cabo de aproximadamente 1-5 minutos.

10 En una realización preferida, el dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral incluye un líquido de transporte de muestra, que puede ser un regulador, y una tira de prueba de cromatografía que contiene uno o varios materiales de vellón o membranas con propiedades capilares a través de las cuales fluye la muestra. Algunos materiales y membranas preferidos para la tira de prueba incluyen, pero no se limitan a, fibras de tereftalato de polietileno (PET), tales como fibras de Dacron®, nitrocelulosa, poliéster, nylon, acetato de celulosa, polipropileno, fibras de vidrio y combinaciones de estos materiales y sus respaldos. En algunas realizaciones de la invención, es innecesario someter a lisis las células en la muestra antes de aplicarla a la tira de prueba.

15 Un método preferido usa un dispositivo de análisis de muestra, por ejemplo, una tira de prueba de cromatografía, para determinar si una infección es bacteriana o viral. En este método, se recolecta una muestra y se transfiere a la tira de prueba de cromatografía. En una realización preferida, la muestra es una muestra que incluye leucocitos. La tira de prueba incluye una zona de reactivo. La zona de reactivo incluye preferiblemente al menos un primer reactivo específico para un marcador bacteriano de manera que, cuando el marcador bacteriano presente en la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado. La zona de reactivo también incluye preferiblemente al menos un segundo reactivo específico para un marcador viral de manera que, cuando el marcador viral presente en la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado. Una zona de detección incluye un asociado de unión de marcador bacteriano que se une al primer complejo marcado y un asociado de unión de marcador viral que se une al segundo complejo marcado. La muestra luego se analiza para detectar la presencia del marcador viral y/o el marcador bacteriano.

20 Una realización preferida de un dispositivo incluye una zona de aplicación de muestra. El dispositivo también incluye una zona de reactivo, que incluye al menos un primer reactivo específico para un marcador bacteriano de manera que, cuando un marcador bacteriano presente en la muestra entra en contacto con el primer reactivo, una primera forma compleja marcada y al menos un segundo reactivo específico de un marcador viral tal que, cuando un marcador viral presente en la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado. Una zona de detección en el dispositivo incluye un asociado de unión de marcador bacteriano que se une al primer complejo marcado y un asociado de unión de marcador viral que se une al segundo complejo marcado. Un ejemplo de un dispositivo que podría usarse es una tira de prueba de cromatografía.

35 En una realización preferida, la presencia del marcador viral o el marcador bacteriano se indica mediante una línea de prueba visible a simple vista. La presencia del marcador viral puede indicarse mediante una primera línea de prueba, mientras que la presencia del marcador bacteriano se indica mediante una segunda línea de prueba. En algunas realizaciones, la primera línea de prueba muestra un primer color cuando es positivo y la segunda línea de prueba muestra un segundo color diferente del primer color cuando es positivo. En realizaciones en las que tanto la primera línea de prueba como la segunda línea de prueba están ubicadas en el mismo espacio en el dispositivo de análisis de muestra, se forma preferiblemente un tercer color cuando tanto la primera línea de prueba como la segunda línea de prueba son positivas. En otras realizaciones, las dos líneas de prueba están espacialmente separadas entre sí en el dispositivo.

40 En una realización preferida, el marcador bacteriano es CRP. En otra realización preferida, el marcador viral es MxA. En algunas realizaciones preferidas, la zona de detección también incluye una línea de control que es visible a simple vista cuando el dispositivo está funcionando.

45 En una realización preferida, el marcador para infección viral es MxA y el marcador para infección bacteriana es proteína C-reactiva (CRP). Los altos niveles de proteína MxA están fuertemente correlacionados con la infección viral sistémica y el aumento de la CRP está más asociado con infecciones bacterianas. La presente divulgación incluye una prueba de cribado infecciosa rápida para identificar MxA y CRP en muestras. MxA está presente en los leucocitos (glóbulos blancos). Por lo tanto, la muestra puede tomarse en cualquier lugar donde estén disponibles los leucocitos, por ejemplo, en una muestra de sangre periférica, aspirado nasofaríngeo, lágrimas, fluido espinal y aspirado del oído medio.

50 En otras realizaciones, pueden usarse otros marcadores para infección viral o infección bacteriana. Por ejemplo, aproximadamente el 12% de los genes del hospedador alteran su expresión después de la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), y un subconjunto de estos genes puede discriminar entre la infección por LCMV virulenta y no virulenta. Los principales cambios de transcripción se han confirmado preliminarmente mediante CRP cuantitativa y estudios de proteínas y son candidatos potencialmente valiosos como biomarcadores para la

- 5 enfermedad de arenavirus. Otros marcadores de infección bacteriana incluyen, entre otros, procalcitonina, inhibidor de tripsina urinaria (uTi), lipopolisacárido, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, ESR y un recuento elevado de WBC (bandas aumentadas), lactato, troponina, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cortisol, proadrenomedulina, marcador inhibidor migratorio de macrófagos, proteína C activada, CD 4,8,13,14 o 64, caspasa, factor de crecimiento derivado de placenta, péptido relacionado con gen de calcitonina, grupo 1 de alta movilidad, coceptina, péptidos natriéticos, proteína de unión a lipopolisacárido, factor alfa de necrosis tumoral, células progenitoras endoteliales circulantes, complemento 3a y receptor desencadenante expresado en células mieloides (trem-1).
- 10 En una realización, las infecciones que se distinguen son infecciones respiratorias. En otras realizaciones, se diferencian otros tipos de infecciones, que pueden ser bacterianas o virales. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, encefalitis, meningitis, gastroenteritis, enfermedades respiratorias febriles (que incluyen bronquitis, faringitis, neumonía), sinusitis, otitis media, infecciones del tracto urinario y conjuntivitis.
- 15 Los dispositivos de flujo lateral son conocidos, y se describen en, por ejemplo, las solicitudes de patente publicadas de los Estados Unidos Nos. 2005/0175992 y 2007/0059682. Otros dispositivos de flujo lateral conocidos en la técnica podrían usarse alternativamente con los sistemas y métodos de la presente invención.
- La Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos No. 2007/0059682 describe la detección de un analito y una muestra que también puede contener una o más sustancias interferentes. Esta publicación enseña a separar el analito de las sustancias interferentes capturando las sustancias interferentes en el portador cromatográfico, y detectando el analito en el portador separado de las sustancias interferentes.
- 20 La Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos No. 2005/0175992 divulga un método para detectar dianas, tales como patógenos y/o componentes asociados a la alergia, en un fluido corporal humano donde la muestra de fluido corporal se recolecta mediante un dispositivo de recolección, tal como un miembro de torunda. Las muestras se transfieren desde el miembro de torunda a un dispositivo de análisis de muestras, en el que puede realizarse un análisis de los objetivos por medios inmunoquímicos o enzimáticos. El resultado de la prueba se puede mostrar en un período de tiempo muy breve y el usuario puede leerlo directamente. Esto permite realizar pruebas en el punto de atención con resultados disponibles durante una visita al paciente.
- 25 En un método de la divulgación, la muestra por analizar se aplica a un portador cromatográfico. El soporte puede estar hecho de un solo material cromatográfico, o preferiblemente varios materiales activos capilares hechos del mismo material o de materiales diferentes y fijados sobre un respaldo de soporte. Estos materiales están en contacto entre sí para formar un camino de transporte a lo largo del cual un líquido impulsado por fuerzas capilares fluye desde una zona de aplicación, pasando una zona de reactivo, hacia una o más zonas de detección y opcionalmente una zona de desechos en el otro extremo del soporte. En otras realizaciones, el líquido pasa la zona de reactivo antes de fluir a la zona de aplicación de muestra. En una realización especialmente preferida, el portador es una tira de prueba cromatográfica.
- 30 Preferiblemente, la muestra se aplica directamente al soporte sumergiendo la zona de aplicación del soporte en la muestra. Alternativamente, la aplicación de la muestra al soporte se puede llevar a cabo recogiendo la muestra con un elemento de limpieza seco o humedecido desde el cual se puede transferir la muestra, opcionalmente después de la humectación, a la zona de aplicación del soporte. Usualmente, el elemento de limpieza es estéril y puede estar seco o ser pretratado con un fluido antes del paso de recolección. Los materiales adecuados para elementos de limpieza pueden comprender materiales sintéticos, tejidos o bandas fibrosas. Algunos ejemplos de tales elementos de limpieza se describen en las Patentes Alemanas DE 44 39 429 y DE 196 22 503.
- 35 Dependiendo del tipo de método de detección, diferentes reactivos están presentes en la zona de reactivo del portador, que, en algunas realizaciones, se ubica preferiblemente entre la zona de aplicación y la zona de detección o, en otras realizaciones, preferiblemente se ubica antes de zona de aplicación. En un inmunoensayo de tipo sándwich, se prefiere tener un reactivo marcado, no inmovilizado en la zona de reactivo que sea específico para cada marcador bacteriano y viral que se está detectando. Por lo tanto, cuando un marcador viral o bacteriano presente en la muestra entra en contacto con el correspondiente reactivo viral o bacteriano presente en la zona de reactivo, se forma un complejo marcado entre el marcador y el correspondiente reactivo marcado. El complejo marcado a su vez es capaz de formar un complejo adicional con una pareja de unión de marcador viral o bacteriano inmovilizado en una línea de prueba en la zona de detección. En un inmunoensayo competitivo, la zona de reactivo contiene preferiblemente un análogo marcador no inmovilizado marcado que compite con el marcador para la pareja de unión del marcador inmovilizado en la zona de detección. Los socios de unión a marcador en la zona de reactivo y en la zona de detección son preferiblemente anticuerpos monoclonales, policlonales o recombinantes o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse específicamente al marcador correspondiente. El método divulgado puede proporcionar la reducción de las sustancias interferentes que podrían estar presentes en la muestra por analizar. Como una sustancia interferente, por ejemplo un anticuerpo humano anti-ratón (HAMA), también puede ser capaz de formar un complejo con el reactivo no inmovilizado marcado de la zona de reactivo y el asociado de unión inmovilizado de la zona de detección, indicando así un resultado de prueba positivo en el inmunoensayo, el soporte puede incluir además al menos una zona de
- 40
- 45
- 50
- 55

5 captura. Cada zona de captura contiene un reactivo de captura inmovilizado que se une específicamente a una determinada sustancia interferente, inmovilizando así la sustancia interferente en la zona de captura. Como la zona de captura está separada de la zona de detección por espacio y la muestra comienza a migrar sobre la zona de reactivo y la zona de captura antes de llegar a la zona de detección del soporte, el método permite separar la sustancia o sustancias interferentes del analito o analitos de interés. Preferiblemente, la zona de captura está situada entre la zona de reactivo y la zona de detección. Sin embargo, la zona de captura también puede estar ubicada entre la zona de aplicación y la zona de reactivo.

10 La detección del marcador se puede lograr en la zona de detección. La molécula de unión inmoviliza el complejo marcado o el análogo marcador marcado mediante reacción inmune u otra reacción en la zona de detección, construyendo así una línea de prueba visible en la zona de detección durante el proceso. Preferiblemente, la etiqueta es una etiqueta ópticamente detectable. La formación de un complejo en la línea de prueba concentra e inmoviliza la etiqueta y la línea de prueba se hace visible a simple vista, lo que indica un resultado positivo en la prueba. Particularmente preferidas son los marcadores directos, y más particularmente las etiquetas de oro que pueden reconocerse mejor a simple vista. Adicionalmente, se puede usar un dispositivo de lectura electrónica (por ejemplo, sobre la base de un transductor fotométrico, acústico, impedimétrico, potenciométrico y/o amperométrico) para obtener resultados más precisos y una semicuantificación del analito. Otras etiquetas pueden ser látex, fluoróforos o fosforóforos.

20 En una realización, la sensibilidad de los ensayos de inmunoensayo de flujo lateral leídos visualmente se mejora añadiendo una pequeña cantidad de colorante fluorescente o conjugados de perlas de látex fluorescentes al material conjugado inicial. Cuando la línea de prueba del espectro visible está visiblemente presente, se observa y registra el resultado de la prueba. Sin embargo, en el caso de positivos débiles que no dan lugar a una línea de prueba visual distinguible, se proyecta una luz de un espectro apropiado, como un espectro UV, se fusiona en la línea de prueba para excitar y hacer fluorescer las perlas de látex fluorescentes que están unidas en la línea de prueba para mejorar el color visible en la línea de prueba.

25 En una realización preferida, los reactivos están configurados de manera que la línea de prueba visible correspondiente a la presencia del marcador viral estará separada de la línea de prueba correspondiente a la presencia del marcador bacteriano. Por lo tanto, se puede determinar fácilmente si la muestra contiene marcadores bacterianos o virales (o ambos) simplemente por la ubicación del desarrollo de las líneas de prueba en la zona de detección. En otra realización preferida, los reactivos se pueden elegir de manera que se desarrollen líneas de prueba de colores diferentes. Es decir, la presencia de un marcador viral provocará el desarrollo de una línea de diferente color que la desarrollada por la presencia de un marcador bacteriano. Por ejemplo, la etiqueta correspondiente al reactivo que reconoce el marcador viral puede ser roja, mientras que la etiqueta correspondiente al reactivo que reconoce el marcador bacteriano puede ser verde. Las etiquetas de diferentes colores que pueden unirse a los reactivos no inmovilizados son bien conocidas. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, oro coloidal, selenio coloidal, carbono coloidal, perlas de látex, perlas paramagnéticas, fluorescentes y quimioluminiscentes y mezclas de los mismos.

40 Las Figuras 4A y 4B muestran una tira (400) de prueba de cromatografía con una línea (402) de prueba correspondiente a la presencia de un marcador viral y una segunda línea (403) de prueba separada que detecta la presencia de un marcador bacteriano. La muestra se aplica a la zona (401) de aplicación de la tira (400) de prueba de cromatografía. Como se muestra en la Figura 4A, la muestra pasa a una zona (460) de reactivos que contiene al menos un asociado de unión viral marcado y al menos un asociado de unión bacteriano marcado que eluye y luego puede migrar con un líquido de transporte de muestra (por ejemplo una solución reguladora). Alternativamente, como se muestra en la Figura 4B, la zona (460) de reactivo está localizada corriente arriba de la zona (401) de aplicación de muestra de modo que los asociados de unión marcados en la zona de reactivo son eluidos por el líquido de transporte de muestra y se desplaza a la muestra. El asociado de unión viral marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador viral de interés para formar un conjugado que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o asociado de unión en la zona de detección. El asociado de unión bacteriana marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés para formar un conjugado que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o asociado de unión en la zona de detección. Aunque no se muestra en estas figuras, una almohadilla absorbente, así como otros componentes de inmunoensayo de flujo lateral conocidos que incluyen, entre otros, una zona de desechos, un respaldo de soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para la lectura del resultado, pueden ser también opcionalmente un componente de la tira (400) de prueba en estas realizaciones.

55 La tira (400) de prueba también incluye una zona (405) de detección que contiene al menos una primera sección para la detección de un marcador viral, por ejemplo una línea (402) de prueba, que incluye una pareja de unión específica inmovilizada, complementaria al complejo de reactivo vírico formado por el marcador viral y su pareja de unión marcada. Por lo tanto, en la línea (402) de prueba, los socios de unión de la zona de detección atrapan a los asociados de unión viral marcados de la zona (460) de reactivo junto con sus marcadores virales unidos. Esta localización del marcador viral con sus asociados de unión marcados da lugar a una indicación en la línea (402) de prueba. En la línea

(402) de prueba, la presencia del marcador viral se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la línea (402) de prueba que resulta de la acumulación de los asociados de unión marcados.

5 La zona (405) de detección también incluye al menos una segunda sección para la detección de un marcador bacteriano, por ejemplo una línea (403) de prueba, que incluye una pareja de unión específica inmovilizada, complementaria al complejo de reactivo bacteriano formado por el marcador bacteriano y su pareja de unión marcada. De este modo, en la línea (403) de prueba, los asociados de unión de la zona de detección atrapan a los asociados de unión bacterianos marcados de la zona (460) de reactivo junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización del marcador bacteriano con sus asociados de unión marcados da lugar a una indicación en la línea (403) de prueba. En la línea (403) de prueba, la presencia del marcador bacteriano se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea (403) de prueba que resulta de la acumulación de asociados de unión marcados. Mientras que la línea (402) de prueba está corriente arriba de la línea (403) de prueba con respecto a la dirección (408) de flujo en las figuras, en realizaciones alternativas, la línea (403) de prueba está corriente arriba de la línea (402) de prueba. En aún otras realizaciones, las líneas (402) y (403) de prueba están ubicadas en la misma ubicación en la tira de prueba.

15 Opcionalmente, la zona (405) de detección puede contener líneas de prueba adicionales para detectar otros marcadores virales y/o bacterianos, así como una línea (404) de control. La línea (404) de control indica que el asociado de unión específico marcado se desplazó a lo largo del ensayo, aunque puede no haber unido marcadores víricos o bacterianos, confirmando así el funcionamiento correcto del ensayo. Como se muestra en las Figuras 4A a 4B, la zona (404) de control está preferiblemente corriente abajo de las líneas de prueba (402) y (403). Sin embargo, en otras realizaciones, la zona (404) de control puede estar situada corriente arriba de una o ambas de las líneas (402) y (403) de prueba.

25 En una realización preferida, la línea (404) de control incluye un anticuerpo u otra proteína recombinante que se une a un componente del medio de elución u otra composición que se usa en la prueba. En realizaciones en las que los ácidos nucleicos son los objetivos, la línea (404) de control preferiblemente incluye un ácido nucleico complementario al ácido nucleico marcado que se usa como un asociado de unión para el ácido nucleico diana.

30 Aunque solo se muestra una línea de prueba en las figuras para cada uno de los marcadores virales y bacterianos, se pueden usar múltiples líneas de prueba para ambos marcadores virales o bacterianos, o cualquiera de ellos, dentro del espíritu de la divulgación. En algunas realizaciones en las que existen múltiples dianas bacterianas y/o virales, la presencia de cada diana preferiblemente corresponde a una línea (402) o (403) de prueba separada. En otras realizaciones, tanto el marcador bacteriano como el marcador viral se detectan en una sola línea de prueba. En estas realizaciones, la presencia de un marcador bacteriano y un marcador viral en la misma línea de prueba tiene características diferentes que la presencia de un marcador bacteriano o vírico solo. Por ejemplo, la presencia de un marcador bacteriano y un marcador viral en la misma línea de prueba puede indicarse visualmente por un color diferente que la presencia de un marcador bacteriano o un marcador viral solo.

35 Un ejemplo de una prueba de cribado rápido para distinguir infección viral y bacteriana se muestra en la Figura 1. Como se discutió anteriormente, MxA es un marcador de diagnóstico para la infección viral, mientras que la CRP es un marcador de diagnóstico para la infección bacteriana. En este ejemplo, una línea azul ("línea de control" en A-D de la figura) representa el control. Una línea verde representa un nivel de proteína C-reactiva (CRP) >15 mg/l ("prueba de CRP" en A-D de la figura). Una línea roja representa un nivel MxA >235 ng/ml ("prueba MxA" en A-D de la figura).  
 40 Un resultado positivo para la proteína MxA, con un resultado negativo para la proteína CRP, indica solo una infección viral (Prueba Visual Resultado A). Un resultado positivo para la (CRP) con un resultado negativo para la proteína MxA indica solo una infección bacteriana (resultado de la prueba visual B). Un resultado positivo para MxA y CRP indica coinfección (infección con una bacteria y un virus) (Resultado de la prueba visual C). Ninguna infección bacteriana o viral está indicada por un resultado negativo para MxA y CRP (resultado de la prueba visual D). Si bien se discuten líneas de color particulares en este ejemplo, se pueden usar otros colores o los mismos colores en diferentes lugares en la tira de prueba para indicar marcadores virales o bacterianos. Cuando se utiliza el desarrollo de líneas de diferentes colores, las líneas pueden estar o no separadas por espacio. En el último caso, las etiquetas se eligen de manera que el color que se ve cuando ambos marcadores están presentes es diferente de los colores que se ven cuando están presentes los marcadores individuales. Por ejemplo, la presencia del marcador viral puede indicarse mediante una línea roja; la presencia del marcador bacteriano por una línea azul; y la presencia de ambos por una línea violeta (combinado rojo y azul).

55 El uso de dos colores para distinguir infección aguda y crónica se muestra en la Figura 2. En el primer casete, solo están presentes anticuerpos IgM, lo que indica una infección aguda. En este casete, la línea de prueba es roja. En el segundo casete, la línea de prueba es azul porque las inmunoglobulinas son IgG. El tercer casete muestra un caso intermedio, donde están presentes anticuerpos IgM e IgG. En consecuencia, la línea de prueba es púrpura. Si bien este ejemplo se muestra para evaluar IgM e IgG, el mismo concepto se usa alternativamente con una sola línea que detecta marcadores virales y bacterianos para la infección.

En otra realización preferida, la tira de prueba también puede incluir una sección de control que indica la funcionalidad de la tira de prueba. La Figura 1 muestra una línea de control. La Figura 2 muestra un ejemplo donde hay una sección de control para los tres casetes. Si está presente, la sección de control puede diseñarse para transmitir una señal al usuario de que el dispositivo ha funcionado. Por ejemplo, la sección de control puede contener un reactivo (por ejemplo, un anticuerpo) que se unirá a los reactivos marcados de la zona de reactivo. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo anti-ratón si el anticuerpo marcado es de origen murino, para confirmar que la muestra ha permeado la tira de prueba. Alternativamente, la sección de control puede contener un reactivo anhidro que, cuando se humedece, produce un cambio de color o formación de color, por ejemplo sulfato de cobre anhidro que se volverá azul cuando se humedezca con una muestra acuosa. Como una alternativa adicional, la sección de control podría contener marcadores virales y bacterianos inmovilizados que reaccionarán con el exceso de reactivo marcado de la zona de reactivo. La sección de control puede estar ubicada corriente arriba o corriente abajo de la zona de detección. Un indicador de control positivo le dice al usuario que la muestra ha permeado la distancia requerida a través del dispositivo de prueba.

La figura 3 compara dos tiras de prueba, la "Adeno 1" y la "Adeno HS", que incluyen líneas de control. En la Adeno 1, tanto el control (línea superior en cada casete) como las líneas de prueba (línea inferior en cada casete) son rojas. En Adeno HS, la línea de control es azul y la línea de prueba es roja. En realizaciones en las que la línea de control es de un color diferente al de la línea de prueba, es más fácil distinguir entre las dos líneas y garantizar que la prueba esté funcionando.

En algunas realizaciones preferidas, los dispositivos y métodos descritos incluyen una zona de lisis para ayudar a diferenciar infecciones virales y bacterianas. En estas realizaciones, la muestra que se ha recogido no se somete a lisis antes de la recolección y transferencia al dispositivo de análisis de muestras. Esto disminuye la cantidad de pasos necesarios para recolectar y preparar la muestra para el análisis. Una situación en la que un agente de lisis mejora la eficacia del ensayo consiste en analizar la presencia de MxA. Como se discutió aquí, la presencia de esta proteína puede ayudar a distinguir entre infección bacteriana y viral en niños febriles. La lisis in situ usando una combinación de 1% a 6% en peso/volumen de CHAPS y de 0.5% a 2% en peso/volumen de NP40 como agente de lisis mejora la detección de MxA en sangre entera fresca o congelada.

En las realizaciones que utilizan un agente de lisis, después de la carga de la muestra, la muestra que se desplaza con el líquido de transporte (regulador) encontrará el agente de lisis. El agente de lisis se habrá precargado y secado preferiblemente en una zona de lisis de la tira de prueba y se eluirá mediante el líquido de transporte. El agente de lisis inicialmente seco se localiza preferiblemente entre la zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo. En realizaciones en las que la zona de reactivo está corriente arriba de la zona de aplicación de muestra, la zona de lisis está corriente abajo de la zona de aplicación de muestras. El agente de lisis es preferiblemente soluble en el líquido de transporte de muestra, y el agente de lisis se solubiliza y activa al entrar en contacto con el líquido de transporte de muestra. El líquido de transporte de muestra contiene entonces tanto agente de lisis en solución o suspensión como componentes de muestra en suspensión. Cualquier componente sensible a la lisis en una muestra, que luego se expone en suspensión al agente de lisis, se somete a lisis in situ. El regulador de desarrollo entonces transporta el analito, incluyendo los componentes libres de lisis, a la zona de detección.

La ubicación donde el agente de lisis se precarga y se seca puede variar según sea necesario. Para maximizar el tiempo que la muestra tiene para interactuar con el agente de lisis así como para minimizar la cantidad de agente de lisis que llega a la zona de detección, el agente de lisis seco puede ubicarse en la zona de aplicación de muestra o justo debajo de esta. O, para minimizar la distancia a lo largo de la cual debe desplazarse el producto de lisis antes de llegar a la zona de reactivo, el agente de lisis seco puede estar ubicado más cerca de la zona de reactivo.

Después de la carga de la muestra, la muestra que se desplaza con el líquido de transporte encontrará el agente de lisis. El agente de lisis se habrá precargado en la tira reactiva y se eluirá mediante el líquido de transporte. En algunas realizaciones preferidas, el agente de lisis se ha secado en la tira de prueba. Alternativamente, el agente de lisis puede ser presecado previamente por secado por congelación o liofilización y luego precargarse en la tira de prueba. En otras realizaciones, el agente de lisis puede ser absorbido, adsorbido, incrustado o atrapado en la tira de prueba. En una realización preferida, el agente de lisis está localizado entre la zona de aplicación de muestra y la zona de reactivo. El agente de lisis es preferiblemente soluble o miscible en el líquido de transporte de muestra, y el agente de lisis se solubiliza y activa al entrar en contacto con el líquido de transporte de muestra. El líquido de transporte de muestra contiene entonces tanto agentes de lisis en solución o suspensión como componentes de muestra en suspensión. Cualquier componente sensible a la lisis en la muestra, que luego se expone en suspensión al agente de lisis, se somete a lisis a sí mismo in situ. El regulador de desarrollo entonces transporta el analito, incluidos los componentes libres de lisis, a través de la zona de reactivo y a la zona de detección.

La ubicación donde se precarga el agente de lisis se puede variar según sea necesario. Para maximizar el tiempo que la muestra tiene para interactuar con el agente de lisis y para minimizar la cantidad de agente de lisis que llega a la zona de detección, el agente de lisis seco, absorbido, adsorbido, incrustado o atrapado puede estar ubicado en o solo corriente abajo de la zona de aplicación de muestra. O, para minimizar la distancia a lo largo de la cual debe



desplazarse el producto lisado antes de llegar a la zona de reactivo, el agente de lisis puede estar ubicado más cerca de la zona de reactivo.

5 La concentración de agente de lisis precargada en una tira de prueba está preferiblemente entre 0.001% y 5% en peso/volumen. El volumen que se precargará depende de dónde se precargó el agente de lisis. Los rangos apropiados son de 1 a 10 microlitros cuando se cargan previamente en el vellón del colector de muestras (la zona de aplicación de la muestra) o de 5 a 50 microlitros cuando se precargan en la almohadilla absorbente o en otros lugares dentro de la tira de prueba. Idealmente, la cantidad precargada debe ser de aproximadamente 3 microlitros precargados en el vellón del colector de muestras o aproximadamente 10 microlitros precargados en la almohadilla absorbente o en otros lugares dentro de la tira reactiva.

10 La selección de un entorno y agente de lisis específico dependerá de los marcadores víricos y bacterianos y del ensayo. El pH y la fuerza iónica son clave para el entorno de lisis. En cuanto al pH establecido por el agente de lisis, un pH inferior a 4.0 tiende a precipitar materiales, especialmente proteínas. Un pH más alto, por encima de aproximadamente 10.0, tiende a someter a lisis materiales como las proteínas y las paredes de las células. Por lo tanto, un pH de aproximadamente 10.0 o superior es preferible para muchas aplicaciones. Alternativamente, puede preferirse un pH más bajo para las dianas de ácidos nucleicos.

15 En cuanto a la fuerza iónica establecida por el agente de lisis, se pueden usar tanto la fuerza iónica alta como la baja para someter a lisis. Por ejemplo, una menor fuerza iónica (hipotónica) tiende a romper los eritrocitos. Por ejemplo, el agua en sí misma puede someter a lisis los eritrocitos. Se pueden usar entornos con mayor fuerza iónica para romper ciertas paredes y membranas celulares.

20 En cuanto a los agentes de lisis específicos, se pueden agrupar y seleccionar en función de sus propiedades: sales, agentes anfóteros y catiónicos, detergentes iónicos y no iónicos. La sal, cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), somete a lisis los eritrocitos. Otras sales, que incluyen, pero no se limitan a, altas concentraciones de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) y cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ), pueden romper ciertas paredes y membranas celulares. Otros agentes de lisis son agentes anfóteros que incluyen, pero sin limitación, Lyso PC, CHAPS y Zwittergent. Alternativamente, se pueden usar agentes catiónicos que incluyen, pero no se limitan a, C16 TAB y cloruro de benzalconio como un agente de lisis. Tanto detergentes iónicos como no iónicos se usan a menudo para romper o someter a lisis los componentes de la pared celular o de la membrana celular, como lipoproteínas y glicoproteínas. Los detergentes iónicos comunes incluyen, pero no se limitan a, SDS, colato y desoxicolato. Los detergentes iónicos son buenos agentes solubilizantes. Los anticuerpos retienen su actividad en 0.1% SDS o menos. Los detergentes no iónicos comunes incluyen, entre otros, octilglucósido, digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20 y Tween 80. Los detergentes no iónicos y los detergentes iónicos suaves son desnaturizantes más débiles y, a menudo, se utilizan para solubilizar proteínas de membrana tales como proteínas de superficie viral. Agentes de lisis adicionales incluyen, pero no se limitan a, urea y enzimas. Se pueden usar combinaciones de diferentes agentes de lisis para optimizar el entorno de lisis.

35 Los tensioactivos son generalmente agentes humectantes y disminuyen la tensión superficial de un líquido. Esto permite una dispersión más fácil al disminuir la tensión interfases entre los líquidos. Por lo tanto, los tensioactivos pueden interferir con la unión natural del antígeno y el anticuerpo o ligando y receptores. Por lo tanto, las concentraciones se eligen experimentalmente para cada clase de agente de lisis. Una vez que se produce la lisis, es importante que las reacciones de unión deseadas no se vean obstaculizadas. Generalmente, el 0.001% de la concentración del agente de lisis se considera el límite inferior, y el límite superior es de aproximadamente el 1%.

40 Existe un efecto aditivo o sinérgico cuando se usan combinaciones de agentes de lisis. Esto amplía el rango de concentración de trabajo para que se ejecute desde aproximadamente 0.001% a 1%. Finalmente, se puede evitar cierta unión no específica indeseable a una concentración de Tween 20 del 5%. En todos los casos, la cantidad total de agente de lisis precargado en todas las ubicaciones de una tira de prueba individual debe ser suficiente para someter a lisis las barreras a la inmunodetección, permitiendo la operación práctica de la tira de prueba.

45 El propio agente de lisis no debería interferir con ningún otro detector de ensayo o agentes indicadores y, por lo tanto, no interfiere con ninguna otra interacción y reacción de ensayo en una extensión tal que impida la operación práctica del ensayo. Un agente de lisis debe tener suficiente vida útil para permitir la fabricación, distribución y almacenamiento antes del uso de una tira reactiva en las pruebas de punto de atención.

50 En realizaciones preferidas donde MxA es el marcador viral, la lisis in situ usando una combinación de 1% a 6% en peso/volumen de CHAPS y de 0.5% a 2% en peso/volumen de NP40 como agente de lisis se usa preferiblemente. Como un ejemplo más específico, 2 microlitros de regulador HEPES 100 mM (pH 8.0) que contiene CHAPS al 5% y NP-40 al 2% con cloruro de sodio 150 mM, BSA al 0.1% y azida de sodio al 0.1% (todos porcentajes peso/volumen) son secados en una zona de lisis de una tira de prueba.

55 En una realización preferida, como se muestra en las Figuras 5A a 5D, la muestra se aplica a la zona (201) de aplicación en una tira (200) de prueba de cromatografía. La muestra pasa por una zona (250) de lisis, donde un agente de lisis se habrá precargado preferiblemente en la tira de prueba y se eluirá mediante el líquido de transporte. El agente de lisis somete a lisis cualquier componente susceptible a la lisis en la muestra in situ.

La tira de prueba cromatográfica contiene una zona (201) de aplicación de muestra, una zona (250) de lisis que contiene un agente de lisis y una zona (260) de reactivo que contiene al menos un asociado de unión marcado que se une a un marcador viral y al menos una pareja de unión etiquetada que se une a un marcador bacteriano que se eluye y luego puede migrar con un líquido de transporte de muestra (por ejemplo, una solución reguladora). Mientras que la zona (260) de reactivo se muestra corriente abajo de la zona de aplicación de muestra en estas figuras, en las realizaciones alternativas, la zona (260) de reactivo podría estar corriente arriba de la zona de aplicación de muestra (ver Figura 4B), siempre que los reactivos encuentren la muestra en algún momento después de que la muestra llega a la zona de lisis y se somete a lisis efectivamente. Los asociados de unión marcados son capaces de unirse específicamente a un marcador viral o bacteriano de interés para formar un conjugado que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o pareja de unión en la zona de detección. Aunque no se muestra en estas figuras, una almohadilla absorbente, así como otros componentes de inmunoensayo de flujo lateral conocidos que incluyen, entre otros, una zona de desechos, un respaldo de soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para la lectura del resultado, también pueden ser opcionalmente componentes de la tira (200) de prueba en estas realizaciones.

En una realización preferida, el agente de lisis se localiza en la zona (250) de lisis entre la zona (201) de aplicación de muestra y la zona (260) de reactivo. El agente de lisis es preferiblemente soluble o miscible en el líquido de transporte de muestra, y el agente de lisis se solubiliza y activa al entrar en contacto con el líquido de transporte de muestra. El líquido de transporte de muestra contiene entonces tanto agente de lisis en solución o suspensión como componentes de muestra en suspensión. Cualquier componente sensible a la lisis en una muestra, que luego se expone en suspensión al agente de lisis, se somete a lisis in situ. El regulador de desarrollo transporta entonces la muestra, incluidos los componentes libres de lisis, a la zona (205) de detección.

La zona (250) de lisis está situada preferiblemente entre la zona (201) de aplicación de muestra y la zona (260) de reactivo, como se muestra en la Figura 5A. En otras realizaciones, la zona (250) de lisis solapa la zona (201) de aplicación de muestra, la zona (260) de reactivo o tanto la zona (201) de aplicación de muestra como la zona (260) de reactivo como se muestra en las figuras 5B, 5C y 5D, respectivamente. Téngase en cuenta que las figuras son esquemáticas y no están dibujadas a escala. La cantidad de solapamiento entre las diferentes zonas (como se muestra en las Figuras 5B a 5D) puede ser muy variable.

La tira (200) de prueba también incluye una zona (205) de detección que contiene una primera sección para la detección de al menos un marcador bacteriano, por ejemplo una línea (203) de prueba, que incluye una pareja de unión específica inmovilizada, complementaria al conjugado bacteriano formado por el marcador bacteriano y su pareja de unión marcada. Por lo tanto, en la línea (203) de prueba, los asociados de unión de la zona de detección atrapan a los asociados de unión marcados con bacterias de la zona (260) de reactivo junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización de los marcadores bacterianos con sus asociados de unión marcados da lugar a una indicación en la línea (203) de prueba. En la línea (203) de prueba, la presencia de un marcador bacteriano se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la línea (203) de prueba que resulta de la acumulación de los asociados de unión marcados.

La zona (205) de detección también incluye una segunda sección para la detección de al menos un marcador viral, por ejemplo una línea (202) de prueba, que incluye una pareja de unión específica inmovilizada, complementaria al conjugado viral formado por el marcador viral y su pareja de unión marcada. De este modo, en la línea (202) de prueba, los socios de unión de la zona de detección atrapan a las parejas de unión marcadas virales de la zona (260) de reactivo junto con sus marcadores virales unidos. Esta localización de los marcadores virales con sus asociados de unión marcados da lugar a una indicación en la línea (202) de prueba. En la línea (202) de prueba, la presencia de un marcador viral se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la línea (202) de prueba que resulta de la acumulación de los asociados de unión marcados. Mientras que la línea (203) de prueba está corriente arriba de la línea (202) de prueba con respecto a la dirección (208) de flujo en las figuras, en realizaciones alternativas, la línea (202) de prueba está corriente arriba de la línea (203) de prueba. En otras realizaciones más, las líneas (202) y (203) de prueba están ubicadas en la misma ubicación en la tira de prueba.

Opcionalmente, la zona (205) de detección puede contener líneas de prueba adicionales para detectar otros marcadores bacterianos y/o virales, así como una línea (204) de control. La línea (204) de control indica que el asociado de unión específico marcado viajó a través de la longitud del ensayo, incluso aunque no haya unido ningún marcador, confirmando así la operación apropiada del ensayo. Como se muestra en las Figuras 5A a 5D, la zona (204) de control está preferiblemente corriente abajo de las líneas (203) y (202) de prueba. Sin embargo, en otras realizaciones, la zona (204) de control puede estar situada corriente arriba de una o ambas de las líneas (203) y (202) de prueba.

En una realización preferida, la línea (204) de control incluye un anticuerpo u otra proteína recombinante que se une a un componente del medio de elución u otra composición que se usa en la prueba. En realizaciones en las que los ácidos nucleicos son los objetivos, la línea (204) de control preferiblemente incluye un ácido nucleico complementario al ácido nucleico marcado que se usa como un asociado de unión para el ácido nucleico diana.

- 5 Aunque solo se muestra una línea de prueba en las figuras, se pueden usar múltiples líneas de prueba. En algunas realizaciones en las que existen objetivos múltiples, la presencia de cada objetivo preferiblemente corresponde a una línea (202) de prueba separada. En otras realizaciones en las que existen objetivos múltiples, la presencia de objetivos múltiples puede indicarse en la misma línea de prueba de modo que la presencia de más de un objetivo tenga características diferentes a la presencia de un único objetivo. Por ejemplo, la presencia de objetivos múltiples en la misma línea de prueba puede estar visualmente indicada por un color diferente que la presencia de cada uno de los objetivos solo.
- 10 En otras realizaciones, es posible tener uno o más agentes de lisis suaves en el propio regulador de ejecución. En estas realizaciones, no hay ningún efecto adverso sobre la zona de reactivo que estará corriente abajo y la muestra puede estar corriente arriba o corriente abajo de la zona de reactivo. Una enzima de lisis en el regulador de desarrollo puede "dirigir" su sustrato y cortarlo para abrir la pared de la célula. Como ejemplo, la penicilina puede eliminar o "perforar un agujero" en una bacteria susceptible. En otras realizaciones, cuando el agente de lisis se aplica al material de recolección de muestra, entonces la zona de reactivo puede estar corriente arriba de la zona de aplicación de muestra.
- 15 Como ejemplo, uno o más agentes de lisis se secan sobre la zona de aplicación de muestra de una tira de flujo lateral. Sobre una base de tira, el agente de lisis está hecho de aproximadamente 2 microlitros de regulador HEPES 100 mM (pH 8.0) que contiene CHAPS al 5% y NP-40 al 2% con cloruro de sodio 150 mM, BSA al 0.1% y azida de sodio al 0.1% (todos los porcentajes peso/volumen). Se añaden hasta 10 microlitros de sangre entera a la zona de aplicación de la muestra para ser sometida a lisis in situ. La proteína MxA se libera desde el interior de los glóbulos blancos para reaccionar con un anticuerpo monoclonal MxA en una etiqueta visual (oro coloidal o perlas de látex visibles). Este complejo se cruza con un regulador de desarrollo que contiene Triton X-100 y es capturado por anticuerpos monoclonales MxA inmovilizados en la línea de prueba de la membrana de nitrocelulosa. Esta unión en la línea de prueba da lugar a una indicación visible.
- 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro para determinar si una infección es bacteriana o viral, que comprende los pasos de:
  - a) recolectar una muestra de sangre;
  - b) transferir la muestra de sangre a una tira de prueba de cromatografía de flujo lateral que comprende:
    - 5 una zona de reactivo que comprende:

al menos un primer asociado de unión marcado que se une a la proteína C-reactiva, de manera que, cuando la proteína C-reactiva presente en la muestra de sangre entra en contacto con el primer asociado de unión marcado, se forma una primera forma compleja marcada; y
    - 10 al menos una segunda pareja de unión marcada que se une a MxA, de manera que, cuando MxA presente en la muestra de sangre entra en contacto con la segunda pareja de unión marcada, se forma una segunda forma compleja marcada;
  - en el que el primer asociado de unión marcado comprende un primer marcador detectable y el segundo asociado de unión marcado comprende un segundo marcador detectable, en el que el primer marcador detectable tiene un primer color y el segundo marcador detectable tiene un segundo color diferente del primer color; y
  - 15 una zona de detección que comprende:

un tercer asociado de unión que se une al primer complejo marcado y se inmoviliza en una primera línea de prueba y un cuarto asociado de unión que se une al segundo complejo marcado y se inmoviliza en la primera línea de prueba o en una segunda línea de prueba;
  - c) someter a lisis la muestra de sangre en la tira de prueba cromatográfica de flujo lateral;
  - 20 d) eluir la muestra de sangre lisada en la tira de prueba; y
  - e) analizar la tira de prueba para detectar la presencia de proteína C-reactiva marcada y/o complejos MxA en la zona de detección.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa e) comprende la subetapa de determinar visualmente un resultado de la zona de detección.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que la presencia de MxA o proteína C-reactiva se indica mediante un resultado positivo visible a simple vista en la primera línea de prueba o en la segunda línea de prueba.
4. El método de la reivindicación 3, donde la presencia de MxA está indicada por la primera línea de prueba o la segunda línea de prueba ubicada en la zona de detección y la presencia de proteína C-reactiva está indicada por la primera línea de prueba ubicada en la zona de detección.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en el que el primer complejo marcado muestra el primer color de la primera etiqueta detectable y el segundo complejo marcado muestra el segundo color de la segunda etiqueta detectable.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el tercer asociado de unión y el cuarto asociado de unión están ubicados en la primera línea de prueba de manera que se forma un tercer color en la primera línea de prueba cuando el método es positivo tanto para proteína C-reactiva como MxA.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en el que el cuarto asociado de unión se inmoviliza en la segunda línea de prueba, espacialmente separada de la primera línea de prueba.
8. Una tira de prueba de cromatografía de flujo lateral para la detección de proteína C-reactiva y/o MxA, que comprende:
  - a) una zona de aplicación de muestra para aplicar una muestra de sangre a la tira de prueba,
  - 40 b) una zona de reactivo que comprende:

al menos un primer asociado de unión marcado que se une a la proteína C-reactiva cuando la proteína C-reactiva está presente en la muestra de sangre para formar un primer complejo marcado; y

al menos un segundo asociado de unión marcado que se une a MxA cuando MxA está presente en la muestra de sangre para formar un segundo complejo marcado;

- 5 en el que el primer asociado de unión marcado comprende un primer marcador detectable y el segundo asociado de unión marcado comprende un segundo marcador detectable, en el que el primer marcador detectable tiene un primer color y el segundo marcador detectable tiene un segundo color diferente del primer color;

c) una zona de detección que comprende:

- 10 un tercer asociado de unión que se une al primer complejo marcado y se inmoviliza en una primera línea de prueba; y

un cuarto asociado de unión que se une al segundo complejo marcado y se inmoviliza en la primera línea de prueba o en una segunda línea de prueba; y

d) una zona de lisis que comprende al menos un agente de lisis, en donde el agente de lisis entra en contacto la muestra de sangre en el dispositivo.

- 15 9. La tira de prueba de cromatografía de flujo lateral de la reivindicación 8, en la que la presencia de MxA o proteína C-reactiva se indica mediante un resultado positivo visible a simple vista en la primera línea de prueba o en la segunda línea de prueba.

10. La tira de prueba de cromatografía de flujo lateral de la reivindicación 8, en la que el cuarto asociado de unión está inmovilizado en la segunda línea de prueba, espacialmente separada de la primera línea de prueba.

- 20 11. La tira de prueba de cromatografía de flujo lateral de la reivindicación 8, en la que el primer complejo marcado muestra el primer color de la primera etiqueta detectable y el segundo complejo marcado muestra el segundo color de la segunda etiqueta detectable.

- 25 12. La tira de prueba de cromatografía de flujo lateral de la reivindicación 11, en la que el cuarto asociado de unión se inmoviliza en la primera línea de prueba de manera que se forma un tercer color en la primera línea de prueba cuando tanto la proteína C-reactiva como MxA están presentes en la muestra de sangre.

13. La tira de prueba de cromatografía de flujo lateral de la reivindicación 8, en la que la zona de aplicación de muestra de sangre está corriente abajo de la zona de reactivo y corriente arriba de la zona de detección.

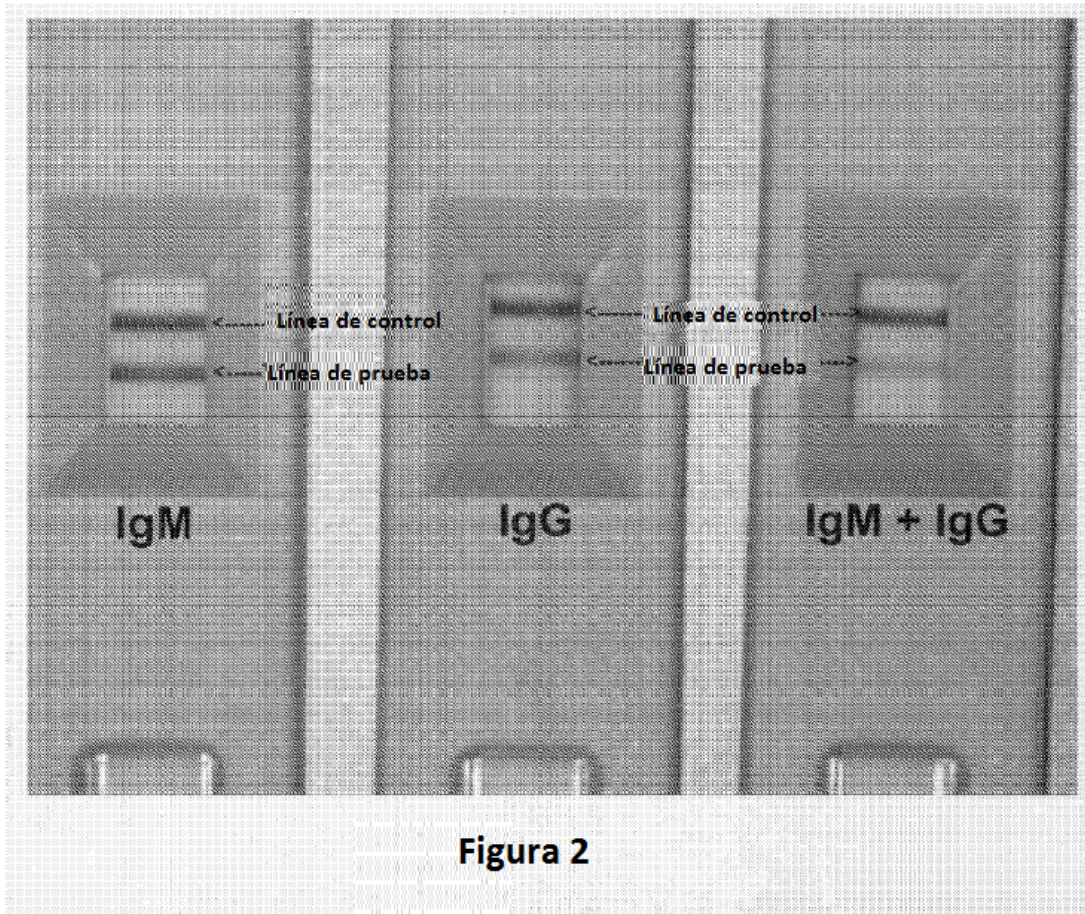
Fig. 1

Estado de la enfermedad	Resultado de la prueba visual	Proteína C reactiva (> 1.5 mg/ml)	MxA (> 235 ng/ml)
Infección viral	A	Negativo	Positivo
Infección bacteriana	B	Positivo	Negativo
Coinfección	C	Positivo	Positivo
No infeccioso	D	Negativo	Negativo

The diagram illustrates the visual results of a lateral flow assay strip for four different conditions (A, B, C, D). Each strip has four horizontal lines: a control line on the left, and three test lines labeled 'Prueba CPR', 'Prueba MxA', and 'Prueba MxA' from left to right. The results are as follows:

- A (Infección viral):** Control line present, CPR test line present, MxA test line present, MxA test line present.
- B (Infección bacteriana):** Control line present, CPR test line present, MxA test line absent, MxA test line present.
- C (Coinfección):** Control line present, CPR test line present, MxA test line present, MxA test line present.
- D (No infeccioso):** Control line present, CPR test line absent, MxA test line absent, MxA test line present.





**Figura 3**





Fig. 4A

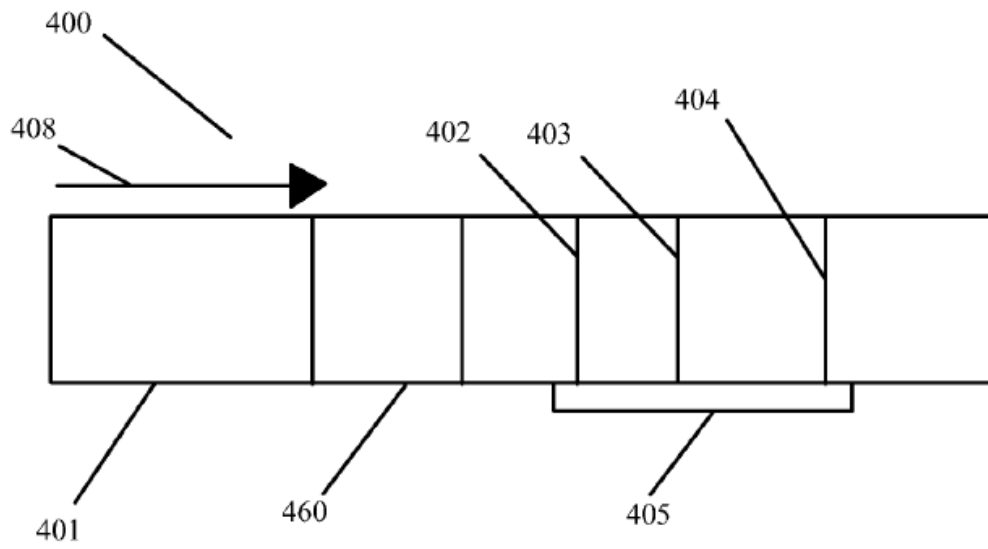


Fig. 4B

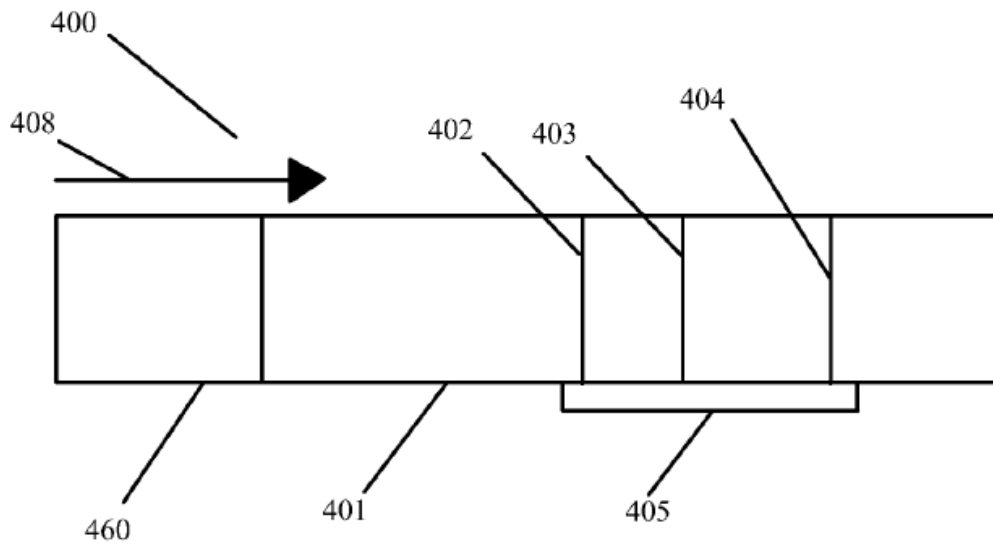


Fig. 5A

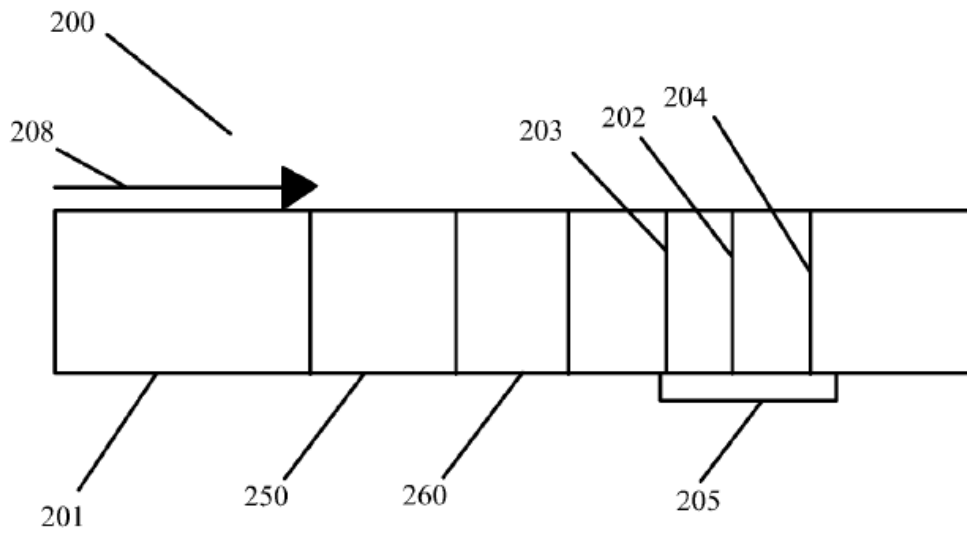


Fig. 5B

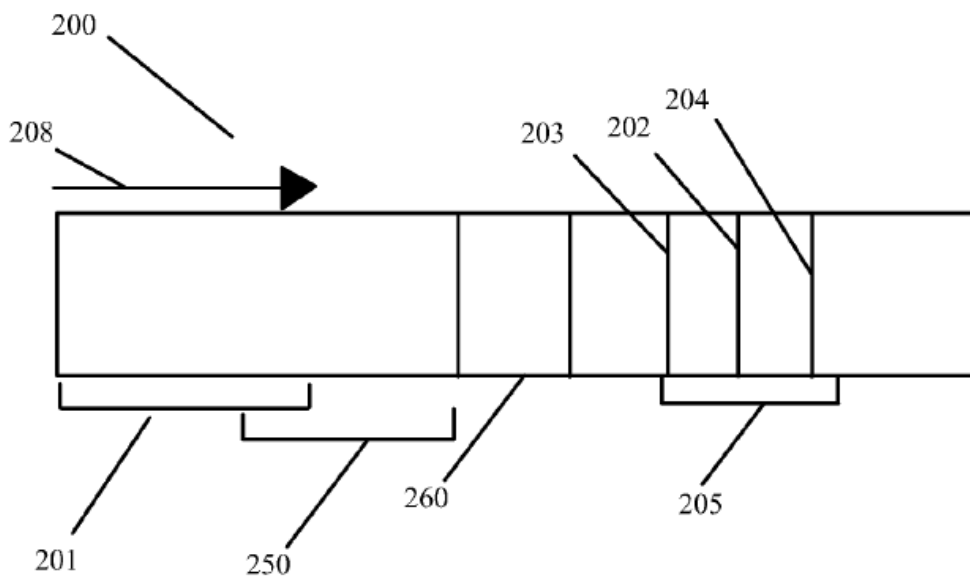


Fig. 5C

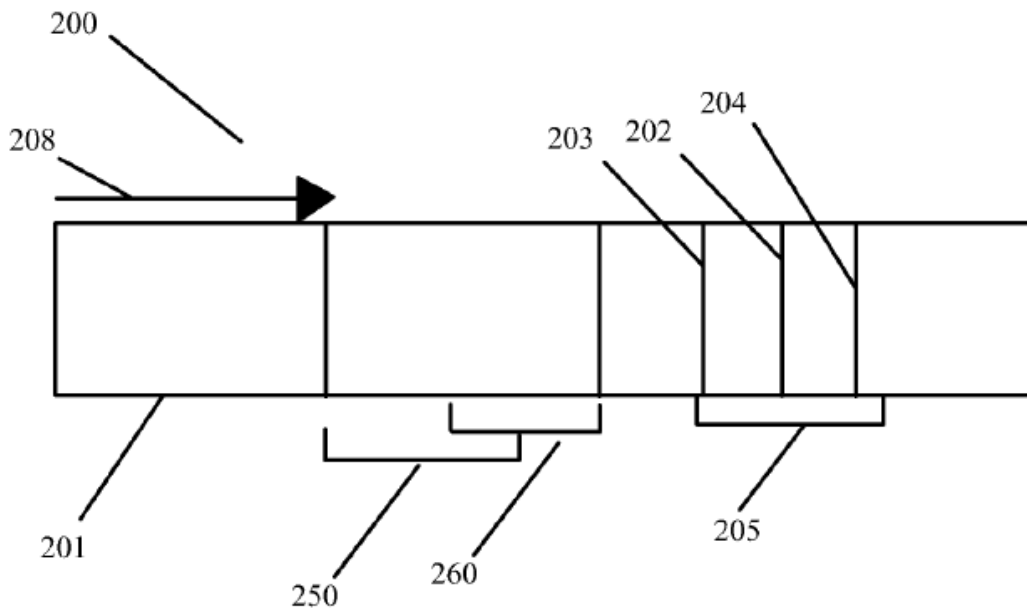


Fig. 5D

