

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 128**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2014 PCT/US2014/019771**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14137858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2014 E 14760721 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2909331**

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

30 Prioridad:

07.03.2013 US 201313788616
08.03.2013 US 201313790125
08.03.2013 US 201313790160

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2020

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.;
BABU, UMA MAHESH y
CONDON, PETER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 743 128 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 víricas y bacterianas

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

10 La invención pertenece al campo de los inmunoensayos de flujo lateral. Más en particular, la invención se refiere a un inmunoensayo de flujo lateral que detecta rápidamente las infecciones víricas y bacterianas.

Descripción de la técnica relacionada

15 La fiebre es una causa común de visitas infantiles a centros de atención urgente tanto para consultas de medicina familiar como pediátricas. Muy frecuentemente, esto se refiere a una infección respiratoria o gastroenteritis. La alta incidencia de fiebre en los niños y la administración preventiva de antibióticos innecesarios es motivo para desarrollar una prueba de detección rápida para los biomarcadores que indique infección vírica y/o bacteriana.

20 A menudo es difícil diferenciar las infecciones víricas de las bacterianas. Esto es especialmente cierto en niños pequeños que no pueden verbalizar sus síntomas y en el entorno ambulatorio donde el acceso al diagnóstico de laboratorio es costoso, consume mucho tiempo y requiere varios días para producir un resultado. Más recientemente, se han identificado muchos marcadores diagnósticos nuevos. Varios de estos marcadores son muy prometedores para diferenciar las infecciones víricas de las bacterianas. Dos de estas proteínas incluyen MxA y la proteína C reactiva (PCR). La mayoría de las infecciones respiratorias están relacionadas con la faringitis, de las cuales el 40 % está causada por virus y el 25-50 % por estreptococos beta.hemolíticos del grupo A. Las causas menores son bronquiolitis aguda y neumonía.

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

30 Alrededor del 80 % de todos los antimicrobianos se recetan en atención primaria y hasta el 80 % de estos son para indicaciones del tracto respiratorio. Las infecciones del tracto respiratorio son, con mucho, la causa más frecuente de tos en la atención primaria. A menudo se recetan antibióticos de amplio espectro para la tos, incluyendo la bronquitis aguda, y muchas de estas recetas beneficiarán a los pacientes solo marginalmente, si es que lo hacen, y pueden causar efectos secundarios y promover la 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.

35 Las proteínas Mx son miembros de la superfamilia de las GTPasas de alto peso molecular. Por consiguiente, Estas GTPasas están reguladas por aumento por los interferones alfa de tipo I/beta de tipo II (IFN). Las Mx GTPasas se expresan exclusivamente en células tratadas con IFN alfa/beta pero no 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 las 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 vírica sobre las otras proteínas inducidas, tal como 2', 5'-oligoadenilato sintetasa, debido a su menor concentración basal, semivida más larga (2,3 días) e inducción rápida. El ARNm de MxA es detectable en glóbulos blancos de sangre periférica aislados estimulados con IFN dentro de 1 a 2 h desde la 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 la sangre periférica es un marcador sensible y específico para la infección vírica. Los niveles más altos de MxA en el grupo de infección vírica en comparación con el grupo de infección bacteriana pueden explicarse 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 citocinas por infección bacteriana. Los niveles séricos de IFN de tipo I permanecen dentro de los límites normales, incluso en pacientes con infecciones bacterianas graves.

45 De manera similar, se ha informado que la mayoría de las infecciones víricas causan poca respuesta de fase aguda y se han utilizado bajas concentraciones de proteína C reactiva (PCR) para distinguir las enfermedades de origen viral de las de etiología bacteriana. Debido a que la concentración plasmática de PCR aumenta rápidamente después de la estimulación y disminuye rápidamente con una semivida corta, la PCR puede ser una herramienta muy útil para diagnosticar y controlar infecciones y enfermedades inflamatorias. En Escandinavia, las pruebas de PCR en el punto de atención son parte de la evaluación de rutina de pacientes con infecciones respiratorias en la práctica general y su uso ha demostrado ser rentable. En la práctica general, la PCR es valiosa en el diagnóstico de enfermedades bacterianas y en la diferenciación entre infecciones bacterianas y víricas. A menudo, se encuentra que el valor diagnóstico de la PCR es superior al de la velocidad de sedimentación globular (VSG) y superior o igual al del recuento

de glóbulos blancos (GB).

Clínicamente, puede ser un desafío diferenciar ciertas infecciones víricas 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 conducir a complicaciones graves, tal como con la faringitis estreptocócica. Muchas veces, los cultivos son difíciles de obtener. Desafortunadamente, los cultivos víricos no se realizan de forma rutinaria debido al retraso significativo en la recepción de resultados. Los nuevos paneles de PCR de detección viral son útiles, pero son caros y no proporcionan información en el punto de atención. Por tanto, sigue siendo necesario una simple prueba de diagnóstico fácil de usar que sea capaz de diferenciar infecciones víricas y bacterianas.

El documento US 2010/0297611 propone un ensayo de flujo lateral.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un ensayo de flujo lateral que es capaz de detectar y diferenciar infecciones víricas y bacterianas. Un dispositivo de diagnóstico en el punto de atención combinado prueba los marcadores de infección vírica y los marcadores de infección bacteriana, para ayudar efectivamente en la rápida diferenciación de infecciones víricas y bacterianas. En una realización preferida, el marcador bacteriano es PCR. En otra realización preferida, el marcador vírico es MxA. En algunas realizaciones de la invención, no es necesario lisar las células de la muestra antes de aplicarla al dispositivo.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método según la reivindicación 1. En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método según la reivindicación 3. En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo según la reivindicación 12. En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo según la reivindicación 14.

En una realización preferida, un método determina si una infección es bacteriana y/o vírica recolectando primero una muestra. A continuación, la muestra se transfiere a un dispositivo de análisis de muestra de dos tiras de doble uso. El dispositivo de análisis de muestras incluye una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral con una primera zona de reactivos y una segunda zona de reactivo. La primera zona de reactivos incluye al menos un primer reactivo específico para un nivel bajo de proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si el nivel bajo de proteína C reactiva está presente en la muestra. La segunda zona de reactivos incluye al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si hay MxA presente en la muestra. La primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral también incluye una primera zona de detección que comprende un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado; y un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado. El dispositivo de ensayo de flujo lateral de dos tiras también incluye una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral incluye al menos una tercera zona de reactivos que incluye al menos un tercer reactivo específico para un nivel alto de proteína C reactiva, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel alto de proteína C reactiva está presente en la muestra. El tercer reactivo en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es más alto que el nivel de proteína C reactiva detectado por el segundo reactivo en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral también incluye una segunda zona de detección con un tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado. La muestra también se analiza para detectar la presencia del nivel bajo de proteína C reactiva, MxA, y el nivel alto de proteína C reactiva.

En otra realización preferida, un dispositivo de ensayo de flujo lateral de dos tiras de doble uso detecta un marcador bacteriano y/o vírico en una muestra. El dispositivo incluye una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral con una primera zona de reactivos y una segunda zona de reactivo. La primera zona de reactivos incluye al menos un primer reactivo específico para un nivel bajo de proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si el nivel bajo de proteína C reactiva está presente en la muestra. La segunda zona de reactivos incluye al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si hay MxA presente en la muestra. La primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral también incluye una primera zona de detección que comprende un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado; y un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado. El dispositivo de ensayo de flujo lateral de dos tiras también incluye una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral incluye al menos una tercera zona de reactivos que comprende al menos un tercer reactivo específico para un nivel alto de proteína C reactiva, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel alto de proteína C reactiva está presente en la muestra. El tercer reactivo en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es más alto que el nivel de proteína C reactiva detectado por el segundo reactivo en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral también incluye una segunda zona de detección con un

tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado.

Otra realización preferida es un método para determinar si una infección es bacteriana y/o vírica e incluye la etapa de recoger una muestra. A continuación, la muestra se transfiere a un dispositivo de análisis de muestras. El dispositivo de análisis de muestras incluye un compresor de muestras con una primera zona de reactivos que incluye al menos un primer reactivo específico para un nivel bajo de proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si el nivel bajo de proteína C reactiva está presente en la muestra y al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si MxA está presente en la muestra y una segunda zona de reactivos que incluye al menos un tercer reactivo específico para un nivel alto de proteína C reactiva, donde el tercer reactivo solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es más alto que el nivel de proteína C reactiva detectado por el segundo reactivo, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel alto de proteína C reactiva está presente en la muestra. El dispositivo también incluye una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral que incluye una primera zona de detección que incluye un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado, un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado y una primera zona de desviación situada aguas arriba de la primera zona de detección en la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La primera zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. El dispositivo también incluye una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral incluye una segunda zona de detección que incluye un tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado y una segunda zona de desviación situada aguas arriba de la primera zona de detección en la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. El dispositivo también incluye una primera zona de aplicación de muestra donde la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestra. La primera zona de aplicación de muestras se encuentra en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la primera zona de reactivos del compresor de muestras. El dispositivo también incluye una segunda zona de aplicación de muestra donde la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestra. La segunda zona de aplicación de muestras se encuentra en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la segunda zona de reactivos del compresor de muestras. El compresor de muestras está en un plano diferente que la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral y la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La primera zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la primera zona de desviación y la segunda zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la segunda zona de desviación, desviando el flujo hacia el compresor de muestras y devolviendo el flujo a la primera tira reactiva cromatográfica y la segunda tira reactiva cromatográfica al final de la primera zona de desviación y la segunda zona de desviación. La muestra se analiza para detectar la presencia del nivel bajo de proteína C reactiva, MxA, y el nivel alto de proteína C reactiva.

Otra realización preferida es un dispositivo de flujo lateral para detectar un analito en una muestra. El dispositivo incluye un compresor de muestras con una primera zona de reactivos que incluye al menos un primer reactivo específico para un nivel bajo de proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si el nivel bajo de proteína C reactiva está presente en la muestra y al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si MxA está presente en la muestra y una segunda zona de reactivos que incluye al menos un tercer reactivo específico para un nivel alto de proteína C reactiva, donde el tercer reactivo solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es más alto que el nivel de proteína C reactiva detectado por el segundo reactivo, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel alto de proteína C reactiva está presente en la muestra. El dispositivo también incluye una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral que incluye una primera zona de detección que incluye un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado, un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado y una primera zona de desviación situada aguas arriba de la primera zona de detección en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La primera zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. El dispositivo también incluye una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral incluye una segunda zona de detección que comprende un tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado y una segunda zona de desviación situada aguas arriba de la primera zona de detección en la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La segunda zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. El dispositivo también incluye una primera zona de aplicación de muestra donde la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestra. La primera zona de aplicación de muestras se encuentra en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la primera zona de reactivos del compresor de muestras. El dispositivo también incluye una segunda zona de aplicación de muestra donde la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestra. La segunda zona de aplicación de muestras se encuentra en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la segunda zona de reactivos del compresor de muestras. El compresor de muestras está en un plano diferente que la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral y la

segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral. La primera zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la primera zona de desviación y la segunda zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la segunda zona de desviación, desviando el flujo hacia el compresor de muestras y devolviendo el flujo a la primera tira reactiva cromatográfica y la segunda tira reactiva cromatográfica al final de la primera zona de desviación y la segunda zona de desviación.

5

En otra realización preferida, un método detecta simultáneamente al menos un analito extracelular y al menos un analito intracelular, recogiendo una muestra y transfiriendo la muestra a un dispositivo de análisis de muestras. La muestra también se lisa y el analito extracelular y el analito intracelular se detectaron simultáneamente en el mismo dispositivo de análisis de muestras. En una realización preferida, el analito extracelular es proteína C reactiva y el analito intracelular es proteína MxA.

10

En otra realización preferida, un método para detectar la proteína MxA y la proteína C reactiva en una muestra incluye las etapas de añadir la muestra a una mezcla de un anticuerpo a la proteína MxA conjugada a un primer marcador y un anticuerpo frente a la proteína C reactiva conjugada a un segundo marcador diferente de la primera etiqueta, detectar una presencia de proteína MxA determinando si el anticuerpo contra la proteína MxA se ha aglutinado y detectar una presencia de proteína C reactiva determinando si el anticuerpo contra la proteína C reactiva se ha aglutinado.

15

En otra realización preferida, un método para detectar la presencia de una infección vírica desconocida en una muestra primero recoge la muestra. A continuación, la muestra se transfiere a una zona de aplicación de muestras de un dispositivo de análisis de muestras. El dispositivo de análisis de muestras incluye una zona conjugada que incluye una nanomicela de ácido siálico con un marcador dentro de la nanomicela y una zona de detección lateralmente aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra, que incluye una nanopartícula homóloga de ácido siálico. La muestra se analiza para obtener un resultado positivo en la zona de detección.

20

25

En otra realización preferida, un método para detectar la presencia de una infección vírica desconocida en una muestra primero recoge la muestra. A continuación, la muestra se transfiere a una zona de aplicación de muestras de un dispositivo de análisis de muestras. El dispositivo de análisis de muestras incluye una zona conjugada con una molécula seleccionada del grupo que consiste en: una nanomicela que incluye un compañero de unión para un virus específico que causa la infección vírica y un marcador y una nanomicela homóloga de ácido siálico que incluye un marcador dentro de la nanomicela. El dispositivo de análisis de muestras también incluye una zona de detección lateralmente aguas abajo de la zona de aplicación de muestra, con una nanopartícula específica para el virus que causa la infección vírica. La muestra se analiza para obtener un resultado positivo en la zona de detección.

30

35

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 6A muestra un dispositivo con una línea de prueba correspondiente a la presencia de un marcador bacteriano, tal como niveles altos de PCR en una realización de la presente invención.

La Figura 6B muestra un dispositivo con una línea de prueba correspondiente a la presencia de un marcador bacteriano tal como niveles elevados de PCR en otra realización de la presente invención.

La Figura 7A muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis situada entre una zona de aplicación de muestras y una zona de reactivos en una realización de la presente invención.

- La Figura 7B muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que se superpone a una zona de aplicación de muestras en una realización de la presente invención.
- La Figura 7C muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que se superpone a una zona de reactivos en una realización de la presente invención.
- La Figura 7D muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que se superpone a una zona de aplicación de muestra y una zona de reactivos en una realización de la presente invención.
- La Figura 8A muestra un dispositivo de análisis de muestras completamente abierto con tiras reactivas duales, así como una zona conjugada y una zona de aplicación de muestras en un compresor de muestras en un plano separado de las tiras reactivas en una realización de la presente invención.
- La Figura 8B muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 8A con parte de la carcasa cerrada, pero la zona conjugada aún visible en el lado izquierdo del dispositivo.
- La Figura 8C muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 8A después de que se ha iniciado la prueba.
- La Figura 9A muestra un resultado de prueba negativo tanto para MxA como para PCR en una realización de la presente invención.
- La Figura 9B muestra un resultado de prueba positivo para MxA en una realización de la presente invención.
- La Figura 9C muestra un resultado de prueba positivo para MxA en una realización de la presente invención.
- La Figura 9D muestra un resultado de prueba positivo para PCR en una realización de la presente invención.
- La Figura 9E muestra un resultado de prueba positivo para PCR en una realización de la presente invención.
- La Figura 9F muestra un resultado de prueba positivo para PCR y MxA, que indica coinfección, en una realización de la presente invención.
- La Figura 10A muestra un dispositivo de análisis de muestras completamente abierto con tiras reactivas dobles y una zona conjugada en un compresor de muestras en un plano separado de las tiras reactivas en una realización de la presente invención.
- La Figura 10B muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 10A con parte de la carcasa cerrada, pero la zona conjugada aún visible en el lado izquierdo del dispositivo.
- La Figura 10C muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 10A después de que se ha iniciado la prueba.
- La Figura 11 muestra un kit para análisis de muestras usando un dispositivo de análisis de muestras en una realización de la presente invención.
- La Figura 12 muestra un dispositivo de análisis de muestras con tiras reactivas duales en otra realización de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona un ensayo de flujo lateral que es capaz de diferenciar entre infecciones víricas y bacterianas. En lugar de analizar analitos específicos para una infección bacteriana o vírica particular, los ensayos de flujo lateral descritos en el presente documento prueban los marcadores de diagnóstico que se producen específicamente en un huésped en respuesta a una infección bacteriana general no especificada y a una infección vírica general no especificada. Los marcadores de diagnóstico son, preferentemente, marcadores de una enfermedad no especificada y/o desconocida de origen bacteriano o vírico. En realizaciones preferidas, los marcadores de diagnóstico son marcadores específicos para una respuesta inmunitaria a una infección bacteriana y/o vírica no especificada y/o desconocida.

10 Un dispositivo de diagnóstico de punto de atención combinado prueba los marcadores de infección vírica y bacteriana y puede ayudar de manera efectiva en la rápida diferenciación de infecciones víricas 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, acontecimientos adversos y resistencia a los antibióticos. El rápido resultado obtenido de la prueba también permite un diagnóstico mientras el médico aún está examinando al paciente. En una realización preferida, el resultado de la prueba se obtiene en menos de 10 minutos después de aplicar la muestra al dispositivo, y preferentemente se lee aproximadamente a los 10 minutos. En muestras que son altamente positivas, la línea de la prueba es visible en un plazo de aproximadamente 1-5 minutos.

15 En una realización preferida de la presente invención, el dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención incluye un líquido de transporte de muestras, que puede ser un tampón y una tira reactiva cromatográfica que contiene uno o varios materiales o membranas de flecos con propiedades capilares a través de las cuales fluye la muestra. Algunos materiales y membranas preferidos para la tira reactiva incluyen, pero sin limitación, 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 refuerzos. En algunas realizaciones de la

invención, no es necesario lisar las células en la muestra o tratar la muestra de ninguna manera antes de aplicarla a la tira reactiva.

5 Un método preferido de la presente invención usa un dispositivo de análisis de muestras, por ejemplo una tira reactiva cromatográfica, para determinar si una infección es bacteriana o vírica. En este método, se recoge una muestra y se transfiere a la tira reactiva cromatográfica. En una realización preferida, la muestra es una muestra que incluye leucocitos. La tira reactiva incluye una zona de reactivos. La zona de reactivos incluye, preferentemente, al menos un primer reactivo específico para un marcador bacteriano tal 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 reactivos también incluye, preferentemente, al menos un segundo reactivo específico para un marcador vírico, tal que, cuando el marcador vírico presente en la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado. Una zona de detección incluye tanto un compañero de unión al marcador bacteriano que se une al primer complejo marcado como un compañero de unión al marcador vírico que se une al segundo complejo marcado. A continuación, la muestra se analiza para detectar la presencia del marcador vírico y/o el marcador bacteriano.

15 Una realización preferida de un dispositivo de la presente invención incluye una zona de aplicación de muestras. El dispositivo también incluye una zona de reactivos, que incluye al menos un primer reactivo específico para un marcador bacteriano tal que, cuando un marcador bacteriano presente en la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primero complejo marcado y al menos un segundo reactivo específico para un marcador vírico tal que, cuando un marcador vírico 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 compañero de unión al marcador bacteriano que se une al primer complejo marcado y un compañero de unión al marcador vírico que se une al segundo complejo marcado. Un ejemplo de un dispositivo que podría usarse es una tira reactiva cromatográfica. En otras realizaciones preferidas, algunas de las zonas del dispositivo están en una o más tiras reactivas cromatográficas, mientras que otras zonas (por ejemplo, la zona de reactivos, la zona de aplicación de muestras y/o el compañero de unión de control) están en un compresor de muestras, separado de y en un plano diferente que la tira reactiva cromatográfica.

30 En una realización preferida, la presencia del marcador vírico o del marcador bacteriano se indica mediante una línea de prueba visible a simple vista. La presencia del marcador vírico puede estar indicada por una primera línea de prueba, mientras que la presencia del marcador bacteriano está indicada por 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 las realizaciones donde tanto la primera línea de prueba como la segunda línea de prueba están situadas en el mismo hueco en el dispositivo de análisis de muestra, se forma, preferentemente, 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 separadas espacialmente entre sí en el dispositivo.

40 Las infecciones víricas y bacterianas son altamente contagiosas y difíciles de diferenciar clínicamente debido a una superposición significativa en los signos y síntomas, lo que a menudo conduce a la prescripción excesiva de antibióticos sistémicos y fomenta la resistencia a los antibióticos. En los países desarrollados, las infecciones respiratorias agudas son la principal causa de morbilidad, representando: 20 % de las consultas médicas, 30 % de las ausencias del trabajo y 75 % de todas las recetas de antibióticos. En EE.UU., hay aproximadamente 76 millones de visitas a la consulta médica anualmente por infección respiratoria aguda. La capacidad de detectar una respuesta inmunitaria a una infección ayuda en la capacidad de diagnóstico clínico para diferenciar las infecciones resultantes de una etiología viral y/o bacteriana.

50 En una realización preferida, el marcador bacteriano es PCR. En otra realización preferida, el marcador vírico es MxA. En algunas realizaciones preferentes, la zona de detección también incluye una línea de control que es visible a simple vista cuando el dispositivo está funcionando.

En una realización preferida, el marcador de infección vírica es MxA y el marcador de infección bacteriana es la proteína C reactiva (PCR). Los niveles altos de proteína MxA se correlacionan fuertemente con la infección vírica sistémica y la PCR aumentada se asocia más con infecciones bacterianas. La presente invención incluye una prueba de detección rápida infecciosa para identificar MxA y PCR en muestras. MxA está presente en los leucocitos (glóbulos blancos). Por lo tanto, la muestra se puede tomar en cualquier lugar en que haya leucocitos disponibles, por ejemplo, en una muestra de sangre periférica, aspirados nasofaríngeos, lágrimas, líquido espinal y aspirados del oído medio.

60 En algunas realizaciones preferentes con una tira reactiva única que contiene PCR y MxA, La concentración umbral de PCR en una muestra necesaria para obtener un resultado positivo es de aproximadamente 6-15 mg/ml. En otras realizaciones preferidas, la concentración umbral de MxA en una muestra para obtener un resultado positivo puede ser tan baja como de aproximadamente 15 ng/ml; sin embargo, la concentración umbral puede ser mayor, en un intervalo de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml. La concentración umbral puede depender del tamaño de la muestra que se aplica a la tira reactiva, así como su dilución, cuando proceda.

65 En algunas realizaciones, los dispositivos y métodos descritos en el presente documento permiten la rápida, visual, detección cualitativa *in vitro* de MxA y PCR directamente de sangre periférica completa. En una realización preferida,

- la prueba mide una respuesta inmunitaria a una sospecha de infección vírica y/o bacteriana en pacientes mayores de un año que se presentan dentro de los siete días posteriores al inicio de la fiebre, con síntomas respiratorios compatibles con enfermedad respiratoria, y con sospecha de diagnóstico de faringitis aguda o neumonía adquirida en la comunidad. Los resultados negativos no necesariamente impiden la infección respiratoria y no deben usarse como la única base para el diagnóstico, tratamiento u otras decisiones de tratamiento. En algunas realizaciones, el uso de pruebas de laboratorio adicionales (por ejemplo, cultivo bacteriano y viral, inmunofluorescencia, la reacción en cadena de la polimerasa viral y la radiografía) y la presentación clínica se usan preferentemente adicionalmente para confirmar si existe un patógeno específico de las vías respiratorias inferiores o faríngeas.
- Además, hay algunas afecciones que conducen a falsos positivos o negativos erróneos. Estas incluyen, pero sin limitación, el uso actual de medicamentos inmunosupresores por parte del paciente que proporciona la muestra, el uso actual de medicamentos antiinfecciosos orales por el paciente que proporciona la muestra, el uso actual de la terapia con interferón (por ejemplo, para la esclerosis múltiple, VIH, VHB, VHC) por el paciente que proporciona la muestra e inmunización viral viva en los últimos 30 días por el paciente que proporciona la muestra. Tanto los falsos negativos como los falsos positivos son posibles, ya que los niveles pueden fluctuar debido a la terapia.
- En realizaciones preferidas, los dispositivos y métodos están destinados para uso profesional en una consulta de ambulatorio o clínica de atención urgente y deben usarse junto con otra información clínica (de laboratorio o radiográfica) y epidemiológica.
- En realizaciones preferidas, un ensayo de tira reactiva cromatográfica doble de doble uso detecta la respuesta inmunitaria del cuerpo a infecciones víricas y/o bacterianas en pacientes usando un patrón multiplexado de resultados. En una realización preferida específica, el ensayo determina la resistencia a Myxovirus A (MxA), niveles bajos de proteína C reactiva (PCR "baja") y niveles altos de proteína C reactiva (PCR "alta"). Se usan, preferentemente, dos tiras reactivas. En algunas realizaciones, también se utiliza un compresor de muestras en un plano diferente de las tiras reactivas cromatográficas. La primera tira reactiva analiza MxA y niveles bajos de proteína C reactiva, y la segunda tira reactiva es un ensayo de niveles altos de proteína C reactiva. La primera tira reactiva y/o el compresor de muestras incluyen reactivos para detectar la proteína MxA y un nivel bajo de proteína C reactiva. La segunda tira reactiva y/o el compresor de muestras incluyen reactivos para detectar un nivel alto de proteína C reactiva. Las dos tiras reactivas se realizan preferentemente una al lado de la otra y cada tira también incluye, preferentemente, una línea de control. Los reactivos de control están, preferentemente, en las tiras reactivas o en el compresor de muestras. Estas pruebas detectan y clasifican las infecciones biológicas como víricas, bacterianas o una coinfección de virus y bacterias. En algunas realizaciones preferentes, el ensayo de tira reactiva cromatográfica doble de doble uso se utiliza para detectar muestras de pacientes con una enfermedad respiratoria febril.
- En algunas realizaciones preferidas con dos tiras reactivas, en la primera tira reactiva, se necesita una concentración umbral de PCR (nivel de PCR "bajo") de aproximadamente 6-15 mg/l (valor de corte en suero) en la muestra para obtener un resultado positivo y se necesita una concentración umbral de al menos 15 ng/ml de MxA en una muestra para obtener un resultado positivo. En otras realizaciones preferidas, la concentración umbral para MxA puede estar en un intervalo de aproximadamente 15 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml para obtener un resultado positivo. La concentración umbral puede depender del tamaño de la muestra que se aplica a la tira reactiva, así como su dilución, cuando proceda. En una realización preferida, la concentración umbral de PCR baja, por ejemplo en suero extracelular de una muestra de sangre, es 7 mg/l para un valor de corte para punción digital, que es equivalente a 10 mg/l para un valor de corte en suero. En una realización preferida, la concentración umbral de MxA, por ejemplo, en células mononucleares de sangre periférica de una muestra de sangre, es 40 ng/ml para un valor de corte para punción digital, que es equivalente a un valor de corte en sangre venosa de 40 ng/ml. En la segunda tira reactiva, se necesita una concentración umbral de PCR (nivel de PCR "alto") de aproximadamente 60-100 mg/l en la muestra para obtener un resultado positivo en algunas realizaciones preferidas. En una realización particularmente preferida, una concentración umbral de PCR alta en la segunda tira reactiva es de aproximadamente 80 mg/l en un valor de corte de punción digital.
- En otras realizaciones, se pueden usar otros marcadores de infección vírica y/o infección bacteriana. Por ejemplo, aproximadamente el 12 % de los genes del huésped 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 cambios importantes en la transcripción han recibido confirmación preliminar mediante PCR cuantitativa y estudios de proteínas y son candidatos potencialmente valiosos como biomarcadores para la enfermedad por arnavirus. Otros marcadores de infección bacteriana incluyen, pero sin limitación, procalcitonina, inhibidor urinario de tripsina (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 la placenta, péptido relacionado con el gen de calcitonina, grupo 1 de alta movilidad, copeptina, péptidos naturéticos, proteína de unión a lipopolisacáridos, factor de necrosis tumoral-alfa, células progenitoras endoteliales circulantes, complemento 3a, y receptor desencadenante expresado en células mieloides (trem-1).
- En una realización, las infecciones que se distinguen son infecciones respiratorias. En otras realizaciones, otros tipos de infecciones, que puede ser bacterianas o víricas, se diferencian usando el sistema de la presente invención.

Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, encefalitis, meningitis, gastroenteritis, enfermedad respiratoria febril (incluyendo bronquitis, faringitis, neumonía), sinusitis, otitis media, infecciones del tracto urinario y conjuntivitis.

5 Los dispositivos de flujo lateral son conocidos y se describen en, por ejemplo, las solicitudes de patente publicadas de Estados Unidos n.º 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.

10 La solicitud de patente publicada de Estados Unidos n.º 2007/0059682 desvela 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 vehículo cromatográfico y detectando el analito en el vehículo separado de las sustancias interferentes.

15 La solicitud de patente publicada de Estados Unidos n.º 2005/0175992 desvela un método para detectar objetivos, tales como patógenos y/o componentes asociados con alergias, en un fluido corporal humano donde la muestra de fluido corporal se obtiene mediante un dispositivo de recolección, tal como un elemento hisopo. Las muestras se transfieren desde el elemento hisopo 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 puede mostrarse en un período de tiempo muy corto y el usuario puede leerlo directamente. Esto permite realizar pruebas en el punto de atención con los resultados disponibles durante una consulta con el paciente. Las invenciones desveladas en esta solicitud
20 relacionada son particularmente ventajosas para el diagnóstico de conjuntivitis.

25 En un método de la invención, la muestra a analizar se aplica a un soporte cromatográfico. El soporte puede estar hecho de un solo material cromatográfico o, preferentemente, de varios materiales activos capilares hechos del mismo material o diferentes y fijados en un soporte de vehículo. Estos materiales están en contacto cercano entre sí para formar una ruta de transporte a lo largo de la cual fluye un líquido impulsado por las fuerzas capilares desde una zona de aplicación, pasando una zona de reactivos, hacia una o más zonas de detección y, opcionalmente, una zona de residuos en el otro extremo del soporte. En otras realizaciones, el líquido pasa a la zona de reactivos antes de fluir hacia la zona de aplicación de la muestra. En una realización especialmente preferida, el soporte es una tira reactiva cromatográfica. En otras realizaciones preferidas, la muestra puede aplicarse a un compresor de muestras en un plano
30 diferente de la tira reactiva cromatográfica y, a continuación, transferirse a la tira reactiva cromatográfica por el compresor de muestras.

35 En algunas realizaciones, la muestra se aplica directamente al soporte sumergiendo la zona de aplicación del soporte en la muestra. Como alternativa, la aplicación de la muestra al soporte puede llevarse a cabo recogiendo la muestra con un elemento de limpieza seco o humedecido desde el cual se puede transferir la muestra, opcionalmente después de humedecer, a la zona de aplicación del soporte. Habitualmente, el elemento de limpieza es estéril y puede estar seco o pretratado con un líquido antes de la etapa de recolección. Los materiales adecuados para limpiar elementos según la invención pueden comprender materiales sintéticos, telas tejidas o mallas fibrosas. Algunos ejemplos de tales elementos de limpieza se describen en las patentes alemanas DE 44 39 429 y DE 196 22 503. En otras realizaciones,
40 la muestra puede obtenerse mediante un recipiente de recolección, tal como una pipeta, y transferido directamente al soporte.

45 Dependiendo del tipo de método de detección, diferentes reactivos están presentes en la zona de reactivos del soporte, que, en algunas realizaciones, está preferentemente situado entre la zona de aplicación y la zona de detección o, en otras realizaciones, se encuentra preferentemente antes de la zona de aplicación. En otras realizaciones más, los reactivos pueden estar en un compresor de muestras separado y en un plano diferente al soporte, incluida la zona de detección.

50 En un inmunoensayo de tipo sándwich, se prefiere tener un marcador, reactivo no inmovilizado en la zona de reactivos que es específica para cada marcador bacteriano y vírico que se está detectando. Por tanto, cuando un marcador vírico o bacteriano presente en la muestra entra en contacto con el reactivo vírico o bacteriano marcado presente en la zona de reactivos, se forma un complejo marcado entre el marcador y el reactivo marcado correspondiente. El complejo marcado a su vez es capaz de formar un complejo adicional con un compañero de unión al marcador vírico o bacteriano inmovilizado en una línea de prueba en la zona de detección. En un inmunoensayo competitivo, la zona
55 de reactivos contiene, preferentemente, un análogo del marcador no inmovilizado marcado que compite con el marcador por el compañero de unión al marcador inmovilizado en la zona de detección. Los compañeros de unión al marcador en la zona de reactivos y en la zona de detección son, preferentemente, anticuerpos monoclonales, policlonales o recombinantes o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse específicamente al marcador correspondiente.
60

65 En una realización preferida, la presente invención proporciona la reducción de las sustancias interferentes que podrían estar presentes en la muestra a analizar. Como 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 reactivos y el compañero de unión inmovilizado de la zona de detección, indicando así un resultado positivo en el inmunoensayo, el soporte puede incluir además al menos una zona de 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. A medida que la zona de captura se separa de la zona de detección por hueco y la muestra comienza a migrar sobre la zona de reactivos y la zona de captura antes de llegar a la zona de detección del soporte, el método permite la separación de la sustancia o sustancias interferentes del analito o analitos de interés. Preferentemente, la zona de captura se encuentra entre la zona de reactivos y la zona de detección. Sin embargo, la zona de captura también puede ubicarse entre la zona de aplicación y la zona de reactivos.

La detección del marcador se puede lograr en la zona de detección. La molécula de unión inmoviliza el complejo marcado o el análogo del marcador marcado por reacción inmunitaria u otra reacción en la zona de detección, creando así una línea de prueba visible en la zona de detección durante el proceso. Preferentemente, el marcador es un marcador ópticamente detectable. La formación de un complejo en la línea de prueba concentra e inmoviliza el marcador y la línea de prueba se hace visible a simple vista, indicando un resultado positivo de la prueba. Son particularmente preferidos los marcadores directos y, más particularmente, los marcadores de oro que pueden reconocerse mejor a simple vista. De manera adicional, un dispositivo de lectura electrónica (por ejemplo, sobre la base de un transductor fotométrico, acústico, impedimétrico, potenciométrico y/o amperiométrico) puede usarse para obtener resultados más precisos y una semicuantificación del analito. Otros marcadores pueden ser látex, fluoróforos o fosforóforos.

En una realización, la sensibilidad de las pruebas de inmunoensayo de flujo lateral leídas visualmente 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 clara, una luz de un espectro apropiado, tal como un espectro UV, se proyecta sobre la línea de prueba para excitar y hacer brillar las perlas de látex fluorescentes que están unidas en la línea de prueba para mejorar el color visible en la línea de prueba.

En una realización preferida, los reactivos están configurados de tal manera que la línea de prueba visible correspondiente a la presencia del marcador vírico estará separada de la línea de prueba correspondiente a la presencia del marcador bacteriano. Por lo tanto, se puede determinar fácilmente si la muestra contenía marcadores bacterianos o víricos (o ambos) simplemente por la ubicación del desarrollo de las líneas de prueba en la zona de detección. En otra realización preferida, los reactivos pueden elegirse de manera que se desarrollen líneas de prueba de diferentes colores. Es decir, la presencia de un marcador vírico provocará el desarrollo de una línea de color diferente a la desarrollada por la presencia de un marcador bacteriano. Por ejemplo, el marcador correspondiente al reactivo que reconoce el marcador vírico puede ser rojo, mientras que el marcador correspondiente al reactivo que reconoce el marcador bacteriano puede ser verde. Los marcadores de diferentes colores que se pueden unir a los reactivos no inmovilizados son bien conocidos. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, oro coloidal, selenio coloidal, carbono coloidal, perlas de látex, perlas paramagnéticas, marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes y sus mezclas.

Las Figuras 4A y 4B muestran una tira reactiva cromatográfica (400) con una línea de prueba (402) correspondiente a la presencia de un marcador vírico y una segunda línea de prueba separada (403) que detecta la presencia de un marcador bacteriano. La muestra se aplica a la zona de aplicación (401) de la tira reactiva cromatográfica (400). Como se muestra en la Figura 4A, a continuación, la muestra pasa a una zona de reactivos (460) que contiene al menos un compañero de unión vírico marcado y al menos un compañero de unión bacteriana marcado que se eluye y luego puede migrar con un líquido de transporte de la muestra (por ejemplo, una solución tampón). Como alternativa, como se muestra en la Figura 4B, la zona de reactivos (460) se encuentra aguas arriba de la zona de aplicación de muestras (401) de tal manera que los compañeros de unión marcados en la zona de reactivos son eluidos por el líquido de transporte de la muestra y viajan a la muestra. El compañero de unión vírico marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador vírico de interés para formar un complejo que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o compañero de unión en la zona de detección. El compañero de unión bacteriano marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés para formar un complejo que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o compañero 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, pero sin limitación, una zona de residuos, un respaldo del soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para leer el resultado, opcionalmente también puede ser un componente de la tira reactiva (400) en estas realizaciones.

La tira reactiva (400) también incluye una zona de detección (405) que contiene al menos una primera sección para la detección de un marcador vírico, por ejemplo, una línea de prueba (402), que incluye un compañero de unión específico inmovilizado, complementario al complejo del reactivo vírico formado por el marcador vírico y su compañero de unión marcado. Por tanto, en la línea de prueba (402), los compañeros de unión a la zona de detección atrapan a los compañeros de unión víricos marcados de la zona de reactivos (460) junto con sus marcadores víricos unidos. Esta localización del marcador vírico con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (402). En la línea de prueba (402), la presencia del marcador vírico se determina mediante la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (402) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.

La zona de detección (405) también incluye al menos una segunda sección para la detección de un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (403), que incluye un compañero de unión específico inmovilizado, complementario al complejo de reactivo bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por tanto, en la línea de prueba (403), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan a los compañeros de unión bacterianos marcados de la zona de reactivos (460) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización del marcador bacteriano con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (403). En la línea de prueba (403), la presencia del marcador bacteriano se determina mediante la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (403) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados. Mientras que la línea de prueba (402) está aguas arriba de la línea de prueba (403) en relación con la dirección del flujo (408) en las figuras, en realizaciones alternativas, la línea de prueba (403) está aguas arriba de la línea de prueba (402). En aún otras realizaciones, las líneas de prueba (402) y (403) se encuentran en la misma ubicación en la tira reactiva.

Opcionalmente, la zona de detección (405) puede contener más líneas de prueba para detectar otros marcadores víricos y/o bacterianos, así como una línea de control (404). La línea de control (404) indica que el compañero de unión específica marcado ha viajado a lo largo del ensayo, a pesar de que puede no haber unido ningún marcador vírico o bacteriano, confirmando así el correcto funcionamiento del ensayo. Como se muestra en las Figuras 4A a 4B, la zona de control (404) está, preferentemente, aguas abajo de las líneas de prueba (402) y (403). Sin embargo, en otras realizaciones, la zona de control (404) puede localizarse aguas arriba de una o ambas líneas de prueba (402) y (403).

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

Aunque solo se muestra una línea de prueba en las figuras para cada uno de los marcadores víricos y bacterianos, se pueden usar múltiples líneas de prueba para ambos o cualquiera de los marcadores víricos y bacterianos dentro del espíritu de la invención. En algunas realizaciones en las que hay múltiples objetivos bacterianos y/o víricos, la presencia de cada objetivo corresponde, preferentemente, a una línea de prueba diferente (402) o (403). En otras realizaciones, tanto el marcador bacteriano como el marcador vírico se detectan en una sola línea de prueba. En estas realizaciones, la presencia de un marcador bacteriano y un marcador vírico 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 vírico en la misma línea de prueba puede indicarse visualmente mediante un color diferente al de la presencia de un marcador bacteriano o un marcador vírico solo.

Se analizaron muestras frescas de sangre completa de pacientes que mostraban síntomas de infecciones víricas (síntomas parecidos a los de la gripe y fiebre de $> 100,5^{\circ}\text{F}$) para determinar qué niveles de MxA en la sangre podrían detectarse con las pruebas de flujo lateral descritas en el presente documento. Los ensayos de flujo lateral utilizados en estos experimentos tenían una configuración similar a la del dispositivo que se muestra en la Figura 4B descrita anteriormente, sin una segunda línea de prueba para la presencia de un marcador bacteriano. Más específicamente, la tira reactiva incluía una zona de reactivos aguas arriba de una zona de aplicación de muestras. La zona de reactivos incluía anticuerpos movilizables contra MxA (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Tokio, Japón) marcados con oro coloidal. La tira reactiva también incluía una línea de prueba en una zona de detección. La línea de prueba incluía un anticuerpo inmovilizado para MxA (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Tokio, Japón). La línea de control en la zona de detección incluía anticuerpo de conejo anti-pollo más Ig de conejo (para un efecto estabilizador adicional), que se une a la IgY de pollo movilizad marcada con perlas de látex azul.

Las muestras de sangre completa se recogieron con EDTA como anticoagulante. En estas pruebas, la cantidad de proteína MxA en las muestras de sangre se determinó utilizando un kit de prueba ELISA de proteínas MxA (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Tokio, Japón). La sangre se lisó 1:10 con la solución de lisis proporcionada en el kit, antes de aplicar a la tira reactiva. Se analizaron 100 μl de sangre lisada en la prueba ELISA. Se usaron 10 μl de sangre lisada como muestra en la prueba de flujo lateral de MxA.

Las muestras de sangre lisadas se aplicaron a la zona de aplicación de la tira reactiva. Los anticuerpos frente a MxA en marcados el reactivo se eluyeron mediante el líquido de transporte de la muestra y viajaron a las muestras de sangre. En la línea de prueba, el anticuerpo frente a MxA inmovilizado atrapó cualquier anticuerpo frente a MxA marcado de la zona de reactivos unido a MxA. Esta localización de MxA con su anticuerpo marcado dio lugar a una indicación visual roja en la línea de prueba si había una concentración suficiente de MxA.

Tabla 1

Concentración del calibrador (ng/ml)	DO	Prueba de flujo lateral de MxA
24	2,223	+
12	1,259	Sombra
6	0,700	No analizado
3	0,391	No analizado
1,5	0,220	No analizado
,75	0,140	No analizado
0,38	0,102	No analizado

5 La Tabla 1 muestra los patrones del kit de ELISA para MxA de la carrera según las instrucciones de la prueba. Tal como se muestra en la Tabla 1, una concentración de MxA de 24 ng/ml produjo un resultado positivo en la prueba de flujo lateral. El patrón del kit se utilizó para generar la curva estándar a partir de la cual se determinaron las concentraciones de MxA.

10 La Tabla 2 muestra los resultados de muestras clínicas de sangre entera fresca de pacientes que muestran síntomas de infecciones víricas (síntomas similares a los de la gripe y fiebre > 100,5 °F)).

Tabla 2

Muestra	DO	Concentración (ng/ml)	Concentración x dilución (10x) (ng/ml)	Prueba de flujo lateral de MxA
A	0,008	0	0	-
B	0,123	0,591	5,911	-
C	1,125	10,489	104,894	+
D	0,111	0,487	4,872	-
E	0,068	0,121	1,211	-
F	0,300	2,177	21,77	+
G	0,027	0	0	-

15 Los valores de DO (densidad óptica) se usaron en combinación con la curva estándar del patrón del kit para determinar la concentración de MxA en las muestras. La columna de concentración (ng/ml) fue la concentración diluida con el agente de lisis. La columna de concentración x dilución (10x) (ng/ml) fue la concentración real en la muestra de sangre entera. Como se muestra en la tabla, la prueba de flujo lateral produjo un resultado positivo para MxA en las muestras C y F, que tenía aproximadamente 105 ng/ml de MxA y aproximadamente 22 ng/ml de MxA, respectivamente, en las muestras.

20 La Tabla 3 muestra los resultados de muestras de sangre entera congeladas de individuos normales del banco de sangre de Tennessee. Ninguna de las muestras de sangre tenía cantidades perceptibles de MxA, y todas fueron negativas en la prueba de flujo lateral.

Tabla 3

Muestra	DO	CONCENTRACIÓN (ng/ml)	CONCENTRACIÓN X DILUCIÓN (10X) (ng/ml)	Prueba de flujo lateral de MxA
1	0,0	0	0	-
2	0,0	0	0	-
3	0,0	0	0	-
4	0,0	0	0	-
5	0,0	0	0	-
6	0,0	0	0	-
7	(0,	0	0	-
8	(0,	0	0	-
9	0,0	0	0	-
10	0,0	0	0	-
11	0,0	0	0	-
12	0,0	0	0	-

25

(continuación)

Muestra	DO	CONCENTRACIÓN (ng/ml)	CONCENTRACIÓN X DILUCIÓN (10X) (ng/ml)	Prueba de flujo lateral de MxA
13	0,0	0	0	-
14	0,0	0	0	-
15	0,0	0	0	-
16	0,0	0	0	-
17	0,0	0	0	-
18	0,0	0	0	-
19	0,0	0	0	-
20	0,0	0	0	-
21	0,0	0	0	-
22	0,1	1,163	11,631	-
23	0,0	0	0	-
24	0,0	0	0	-
25	0,0	0	0	-

La Tabla 4 muestra muestras de sangre entera recién congeladas de BioReclamation (BioReclamation, Hicksville, NY) de pacientes con síntomas evidentes de infecciones víricas (síntomas similares a los de la gripe y fiebre > 100,5 °F). Ninguno de estos pacientes tenía una DO que correspondiera a niveles de MxA superiores a aproximadamente 8 ng/ml. Estas muestras fueron todas negativas en la prueba de flujo lateral.

5

Tabla 4

Muestra	DO	Concentración (ng/ml)	Concentración x dilución (10x) (ng/ml)	Prueba de flujo lateral de MxA
26	0,029	0	0	-
27	0,026	0	0	-
28	0,018	0	0	-
29	0,146	0,792	7,92	-
30	0,004	0	0	-
31	0,128	0,635	6,35	-

Los resultados de estas pruebas indican que las pruebas de flujo lateral descritas en el presente documento pueden detectar niveles de MxA al menos tan bajos como aproximadamente 20 ng/ml en una muestra de 10 µl (diluido a 1:10).

10

Un ejemplo de una prueba de detección rápida para distinguir la infección vírica y bacteriana se muestra en la Figura 1. Como se ha mencionado anteriormente, MxA es un marcador de diagnóstico para infección vírica, mientras que la PCR 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 (PCR) > 15 mg/l ("prueba de PCR" en A-D de la figura). Una línea roja representa un nivel de MxA > 20 ng/ml ("prueba de MxA" en A-D de la figura). Un resultado positivo para la proteína MxA, con un resultado negativo para la proteína PCR indica solo una infección vírica (resultado visual de la prueba A). Un resultado positivo para (PCR) con un resultado negativo para la proteína MxA indica solo una infección bacteriana (resultado visual de la prueba B). Un resultado positivo tanto para MxA como PCR indica coinfección (infección con una bacteria y con un virus) (resultado visual de la prueba C). Un resultado negativo para MxA y PCR indica ausencia de infección bacteriana o vírica (resultado visual de la prueba D). Si bien las líneas de color concretas se tratan en este ejemplo, otros colores o los mismos colores en lugares diferentes en la tira reactiva para indicar marcadores víricos o bacterianos, están dentro del alcance de la presente invención.

15

20

25

Cuando se usa el desarrollo de líneas coloreados diferentes, las líneas pueden o no estar separadas por un hueco. En el último caso, los marcadores se eligen de tal manera que el color que se ve cuando ambos marcadores están presentes es diferente de los colores que se ven cuando los marcadores individuales están presentes. Por ejemplo, la presencia del marcador vírico puede estar indicada por una línea roja; la presencia del marcador bacteriano por una línea azul; y la presencia de ambos por una línea púrpura (rojo y azul combinados).

30

El uso de dos colores para distinguir la infección aguda y crónica se muestra en la Figura 2. En el primer casete, solo los anticuerpos IgM están presentes, 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, en el que están presentes los anticuerpos IgM e IgG. En consecuencia, la línea de prueba es púrpura. Si bien se muestra este ejemplo para analizar la IgM y la IgG, el mismo concepto se usa alternativamente con una sola

35

línea que detecta los marcadores tanto víricos como bacterianos de infección.

En otra realización preferida, la tira reactiva también puede incluir una sección de control que indica la funcionalidad de la tira reactiva. 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 reactivos. En una realización preferida, se usa la IgY conejo anti-pollo como línea de control y la IgY de pollo conjugada con un marcador, por ejemplo, perlas de látex azul, es el conjugado de control. Como alternativa, 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 alternativa adicional, la sección de control podría contener marcadores víricos y bacterianos inmovilizados que reaccionarán con el exceso de reactivo marcado de la zona de reactivos. La sección de control puede encontrarse aguas arriba o aguas abajo de la zona de detección. Un indicador de control positivo le dice al usuario que la muestra ha penetrado la distancia requerida a través del dispositivo de prueba.

La figura 3 compara dos tiras reactivas, la "Adeno 1" y la "Adeno HS", ambas de las cuales incluyen líneas de control. En Adeno 1, tanto las líneas de control (línea superior en cada casete) como la 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 las realizaciones donde la línea de control es de un color diferente que la línea de prueba, es más fácil distinguir entre las dos líneas y asegurarse de que la prueba está funcionando.

En algunas realizaciones preferentes, los dispositivos y métodos de la presente invención incluyen una zona de lisis para ayudar a diferenciar las infecciones víricas y bacterianas. En estas realizaciones, la muestra que se ha obtenido se lisa antes de la recolección y transferencia al dispositivo de análisis de muestras. Esto disminuye el número de etapas necesarias para recolectar y preparar la muestra para el análisis. Una situación en la que un agente de lisis mejora la eficiencia del ensayo es analizar la presencia de MxA. Tal como se trata en el presente documento, la presencia de esta proteína puede ayudar a distinguir entre infección bacteriana y vírica en niños febriles. La lisis *in situ* usando una combinación de CHAPS de 1 % a 6 % en peso/volumen y NP40 de 0,5 % a 2 % en peso/volumen como agente de lisis mejora la detección de MxA en sangre entera fresca o congelada.

En las realizaciones que utilizan un agente de lisis, tras la carga de la muestra, la muestra que viaja con el líquido de transporte (tampón) encontrará el agente de lisis. Preferentemente el agente de lisis se habrá cargado previamente en la tira reactiva y se eluirá con el líquido de transporte. En algunas realizaciones preferidas, el agente de lisis se ha secado en la tira reactiva. Como alternativa, el agente de lisis puede secarse previamente mediante secado por congelación o liofilización y, a continuación, precargarse en la tira reactiva. En otras realizaciones, el agente de lisis puede ser absorbido, adsorbido, incluido o atrapado en la tira reactiva. El agente de lisis inicialmente seco se localiza, preferentemente, entre la zona de aplicación de muestras y una zona de reactivos. En realizaciones en las que la zona de reactivos está aguas arriba de la zona de aplicación de muestras, la zona de lisis está aguas abajo de la zona de aplicación de muestras. El agente de lisis es, preferentemente, soluble en el líquido de transporte de la muestra y el agente de lisis se solubiliza y se activa al entrar en contacto con el líquido de transporte de la muestra. El líquido de transporte de la muestra contiene tanto el agente de lisis en solución o suspensión como los componentes de la muestra en suspensión. Cualquier componente susceptible a la lisis en una muestra, tras estar expuesto en suspensión al agente de lisis, están lisados *in situ*. Así, el tampón de carrera transporta el analito, incluyendo cualquier componente liberado por 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 secado, absorbido, adsorbido, incluido o atrapado puede ubicarse en la zona de aplicación de la muestra o justo debajo de ella. O, para minimizar la distancia a lo largo de la cual debe viajar el producto de lisis antes de llegar a la zona de reactivos, el agente de lisis seco puede ubicarse más cerca de la zona de reactivos. En otras realizaciones, el agente de lisis puede incluirse en el tampón de carrera.

La concentración de agente de lisis precargado en una tira reactiva está, preferentemente, entre 0,001 % y 5 % en peso/volumen. El volumen a precargar depende de dónde esté precargado el agente de lisis. Los intervalos apropiados son de 1 a 10 microlitros cuando se cargan previamente en los flecos colectores de muestras (la zona de aplicación de la muestra) o de 5 a 50 microlitros cuando se cargan previamente en la almohadilla absorbente o en otros lugares dentro de la tira reactiva. Idealmente, la cantidad precargada debe ser de aproximadamente 3 microlitros precargados en los flecos colectores de muestras o aproximadamente 10 microlitros precargados en la almohadilla absorbente o en otros lugares dentro de la tira reactiva.

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 por debajo de 4,0 tiende a precipitar materiales, especialmente proteínas. Un pH más alto, por encima de aproximadamente 10,0, tiende a lisar materiales, tales como proteínas y paredes celulares. Por lo tanto, un pH de aproximadamente 10,0 o superior es preferible para muchas aplicaciones. Como alternativa, se puede preferir un pH

más bajo para objetivos de ácido nucleico.

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

En cuanto a los agentes de lisis específicos, se pueden agrupar y seleccionar en función de sus propiedades: sales, agentes anfotéricos y catiónicos, detergentes iónicos y no iónicos. La sal, cloruro amónico (NH₄Cl), lisa los eritrocitos. Otras sales, incluyendo, pero sin limitación, altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl), pueden romper ciertas paredes celulares y membranas. Otros agentes de lisis son agentes anfotéricos que incluyen, pero sin limitación, Lyso PC, CHAPS y Zwittergent. Como alternativa, los agentes catiónicos que incluyen, pero sin limitación, C16 TAB y cloruro de benzalconio, pueden usarse como agente de lisis. Los detergentes tanto iónicos como no iónicos se usan a menudo para romper o lisar la pared celular o los componentes de la membrana celular, como las lipoproteínas y las glicoproteínas. Los detergentes iónicos comunes incluyen, pero sin limitación, SDS, colato y desoxicolato. Los detergentes iónicos son buenos agentes solubilizantes. Los anticuerpos retienen su actividad en 0,1 % de SDS o menos. Los detergentes no iónicos comunes incluyen, pero sin limitación, octilglucósido, digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20 y Tween 80. Los detergentes no iónicos e iónicos suaves son desnaturizantes más débiles y a menudo se usan para solubilizar proteínas de membrana, tales como las proteínas de la superficie del virus. Los agentes de lisis adicionales incluyen, pero sin limitación, urea y enzimas. Se pueden utilizar combinaciones de diferentes agentes de lisis para optimizar el entorno de lisis.

Los tensioactivos son generalmente agentes humectantes y reducen la tensión superficial de un líquido. Esto permite una difusión más fácil al reducir la tensión interfacial entre líquidos. Por tanto, los tensioactivos pueden interferir con la unión natural de antígeno y anticuerpo o ligando y receptores. Las concentraciones, por lo tanto, 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. En general, una concentración de 0,001% de agente de lisis se considera el límite inferior y el límite superior es aproximadamente 1 %. Hay un efecto aditivo o sinérgico cuando se usan combinaciones de agentes de lisis. Esto amplía el intervalo de trabajo de concentración para correr de aproximadamente 0,001 % a 1 %. Por último, puede evitarse alguna unión no específica no deseada a una concentración de Tween 20 del 5 %. En todos los casos, la cantidad total de agente de lisis precargada en todas las ubicaciones de una tira reactiva individual debe ser suficiente para lisar las barreras a la inmunodetección, lo que permite la operación práctica de la tira reactiva.

El agente de lisis en sí no debe interferir con ningún otro detector o agente indicador del ensayo y, por lo tanto, no interfiere con ninguna otra interacción y reacción del ensayo hasta el punto de evitar el funcionamiento práctico del ensayo. Un agente de lisis debe tener una vida útil suficiente para permitir la fabricación, distribución y almacenamiento antes del uso de una tira reactiva en pruebas en el punto de atención.

En realizaciones preferidas en las que MxA es el marcador vírico, preferentemente se usa lisis *in situ* usando una combinación de CHAPS de 1 % a 6 % en peso/volumen y de 0,5 % a 2 % en peso/volumen de NP40 como agente de lisis. Como un ejemplo más específico, 2 microlitros de tampón HEPES 100 mM (pH 8,0) que contiene 5 % de CHAPS y 2 % de NP-40 con cloruro de sodio 150 mM, 0,1 % de BSA y 0,1 % de azida sódica (todos los porcentajes en peso/volumen) se secan en una zona de lisis de una tira reactiva.

En una realización preferida, como se muestra en las Figuras 5A a 5D, la muestra se aplica a la zona de aplicación (201) en una tira reactiva cromatográfica (200). La muestra pasa a una zona de lisis (250), en la que, preferentemente, un agente de lisis se habrá cargado previamente en la tira reactiva y el líquido de transporte lo eluirá. El agente de lisis lisa cualquier componente susceptible a la lisis en la muestra *in situ*.

La tira reactiva cromatográfica contiene una zona de aplicación de muestras (201), una zona de lisis (250) que contiene un agente de lisis y una zona de reactivos (260) que contiene al menos un compañero de unión marcado que se une a un marcador vírico y al menos un compañero de unión marcado que se une a un marcador bacteriano que se eluye y luego puede migrar con un líquido de transporte de muestras (por ejemplo, una solución tampón). Aunque que la zona de reactivos (260) se muestra aguas abajo de la zona de aplicación de muestras en estas figuras, en realizaciones alternativas, la zona de reactivos (260) podría estar aguas arriba de la zona de aplicación de muestras (véase la Figura 4B), siempre que los reactivos encuentren la muestra en algún momento después de que la muestra alcance la zona de lisis y se lise de manera efectiva. Los compañeros de unión marcados son capaces de unirse específicamente a un marcador vírico o bacteriano de interés para formar un complejo que, a su vez, es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o compañero 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, pero sin limitación, una zona de residuos, un respaldo del soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para leer el resultado, opcionalmente también puede ser un componente de la tira reactiva (200) en estas realizaciones.

En una realización preferida, el agente de lisis se localiza en la zona de lisis (250) entre la zona de aplicación de

muestras (201) y la zona de reactivos (260). El agente de lisis es, preferentemente, soluble o miscible en el líquido de transporte de la muestra, y el agente de lisis se solubiliza y se activa al entrar en contacto con el líquido de transporte de la muestra. El líquido de transporte de la muestra contiene tanto el agente de lisis en solución o suspensión como los componentes de la muestra en suspensión. Cualquier componente susceptible a la lisis en una muestra, tras estar
5 expuesto en suspensión al agente de lisis, están lisados *in situ*. Así, el tampón de carrera transporta la muestra, incluyendo cualquier componente liberado por lisis, a la zona de detección (205).

La zona de lisis (250) se encuentra, preferentemente, entre la zona de aplicación de muestras (201) y la zona de reactivos (260), como se muestra en la Figura 5A. En otras realizaciones, la zona de lisis (250) se superpone a la zona
10 de aplicación de muestras (201), la zona de reactivos (260) o la zona de aplicación de muestras (201) y la zona de reactivos (260) como se muestra en las Figuras 5B, 5C y 5D, respectivamente. Cabe destacar que las figuras son esquemáticas y no están dibujadas a escala. La cantidad de superposición entre las diferentes zonas (como se muestra en las Figuras 5B a 5D) puede ser muy variable.

15 La tira reactiva (200) también incluye una zona de detección (205) que contiene una primera sección para la detección de al menos un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (203), que incluye un compañero de unión específico inmovilizado, complementario al conjugado bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por tanto, en la línea de prueba (203), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan a
20 los compañeros de unión marcados bacterianos de la zona de reactivos (260) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización de los marcadores bacterianos con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (203). En la línea de prueba (203), la presencia de un marcador bacteriano se determina mediante la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (203) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.

25 La zona de detección (205) también incluye una segunda sección para la detección de al menos un marcador vírico, por ejemplo, una línea de prueba (202), que incluye un compañero de unión específico inmovilizado, complementario al conjugado vírico formado por el marcador vírico y su compañero de unión marcado. Por tanto, en la línea de prueba (202), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan a los compañeros de unión marcados víricos de la
30 zona de reactivos (260) junto con sus marcadores víricos unidos. Esta localización de los marcadores víricos con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (202). En la línea de prueba (202), la presencia de un marcador vírico se determina mediante la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (202) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados. Mientras que la línea de prueba (203) está aguas arriba de la línea de prueba (202) en relación con la dirección del flujo (208) en las figuras, en realizaciones alternativas, la línea de prueba (202) está aguas arriba de la línea de prueba (203). En aún otras
35 realizaciones, las líneas de prueba (202) y (203) se encuentran en la misma ubicación en la tira reactiva.

Opcionalmente, la zona de detección (205) puede contener más líneas de prueba para detectar otros marcadores bacterianos y/o víricos, así como una línea de control (204). La línea de control (204) indica que el compañero de unión específica marcado ha viajado a lo largo del ensayo, aunque no haya unido ningún marcador, confirmando así el
40 correcto funcionamiento del ensayo. Como se muestra en las Figuras 5A a 5D, la zona de control (204) está, preferentemente, aguas abajo de las líneas de prueba (203) y (202). Sin embargo, en otras realizaciones, la zona de control (204) puede localizarse aguas arriba de una o ambas líneas de prueba (203) y (202).

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

50 Aunque solo se muestra una línea de prueba en las figuras, múltiples líneas de prueba están dentro del espíritu de la invención. En algunas realizaciones en las que hay múltiples objetivos, la presencia de cada objetivo corresponde, preferentemente, a una línea de prueba separada (202). En otras realizaciones en las que hay múltiples objetivos, la presencia de múltiples objetivos puede indicarse en la misma línea de prueba, de modo que la presencia de más de un objetivo tiene características diferentes que la presencia de un solo objetivo. Por ejemplo, la presencia de múltiples
55 objetivos en la misma línea de prueba puede indicarse visualmente por un color diferente que la presencia de cada uno de los objetivos por sí solo.

En otras realizaciones, es posible tener uno o más agentes de lisis suaves en el tampón de carrera. En estas realizaciones, no hay ningún efecto adverso en la zona de reactivos que estará aguas abajo y la muestra puede estar
60 aguas arriba o aguas abajo de la zona de reactivos. Una enzima de lisis en el tampón de carrera puede "atacar" a su sustrato y cortarlo para abrir la membrana celular o la pared celular. Como ejemplo, la penicilina puede eliminar o "perforar un orificio" en una bacteria susceptible. En otras realizaciones, cuando el agente de lisis se aplica al material de recogida de muestras, entonces la zona de reactivos puede estar aguas arriba de la zona de aplicación de muestras.

65 Como ejemplo, uno o más agentes de lisis se secan sobre la zona de aplicación de muestras de una tira de flujo lateral. Por tira, el agente de lisis está hecho de aproximadamente 2 microlitros de tampón HEPES 100 mM (pH 8,0) que

contiene 5 % de CHAPS y 2 % de NP-40 con cloruro de sodio 150 mM, 0,1 % de BSA y 0,1 % de azida sódica (todos los porcentajes en peso/volumen). A continuación, se añaden hasta 10 microlitros de sangre entera a la zona de aplicación de muestras para ser lisados *in situ*. La proteína MxA se libera desde el interior de los glóbulos blancos para reaccionar con un anticuerpo monoclonal frente a MxA en un marcador visual (oro coloidal o perlas de látex visibles).

5 Este complejo atraviesa un tampón de carrera que contiene Triton X-100 y es capturado por los anticuerpos monoclonales frente a 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.

Dispositivo de análisis de muestras con tiras reactivas bimodales dobles

10 MxA es un derivado de las células de interferón alfa/beta que se eleva en presencia de infecciones víricas pero no es específico para un tipo particular de virus. La expresión de la proteína MxA en sangre periférica es un marcador sensible y específico para la infección vírica.

15 MxA inhibe la replicación de una amplia gama de virus. MxA tiene una concentración basal baja [menos de 50 ng/ml] y una inducción rápida [1-2 horas]. Alcanza su punto máximo a las 16 horas y permanece elevado en presencia de interferón elevado. MxA también tiene una semivida larga [2,3 días] y títulos constantes en presencia de interferonemia. Las infecciones víricas elevan los niveles de MxA mientras que solo tienen un aumento modesto en los niveles de PCR.

20 En un ensayo clínico prospectivo con ELISA (Towbin H et al. J Interferon Res 1992;12:67-74), el ensayo reclutó a 87 adultos sanos normales. Se midió que los niveles de MxA eran < 5 ng/ml en el 66 % de los adultos, entre 5-50 ng/ml en el 29 % de los adultos y más de 50 ng/ml en el 5 % de los adultos.

25 Otro ensayo clínico prospectivo con ELISA (Chieux V et al., J Virol Methods 1998;70:183-191) reclutó a 174 niños. 45 de estos niños tenían fiebre aguda (infección respiratoria y/o gastroenteritis) y había 30 controles de edades equivalentes. Los valores de MxA fueron 7 ng/ml \pm 7 ng/ml en los 30 controles de edades equivalentes. Los valores de MxA fueron 10 ng/ml \pm 6 ng/ml en 13 infecciones bacterianas confirmadas.

30 Otro ensayo clínico prospectivo con ELISA incluyó a 60 pacientes (Kawamura M et al. J Clin Lab Anal 2012;26:174-183). 42 de los pacientes tenían fiebre aguda (infección respiratoria y/o gastroenteritis) y había 18 controles de edades equivalentes. La mediana del valor de MxA fue de 110,0 ng/ml en 31 infecciones víricas confirmadas. La mediana del valor de MxA fue de 10,6 ng/ml en 11 infecciones bacterianas confirmadas. La mediana del valor de MxA fue de 2,0 ng/ml en los 18 controles de edades equivalentes. La prueba ELISA tenía una sensibilidad del 87,1 % y una especificidad del 90,9 % para diferenciar la infección vírica de la bacteriana, pero solo se analizaron los valores de MxA para hacer esta determinación. Los pacientes con infección vírica se distinguieron claramente de los controles sanos con un 100 % de sensibilidad y especificidad. Se usó un valor de corte de 36,7 ng/ml de MxA para determinar la infección vírica por ELISA en este estudio.

40 Otro ensayo clínico prospectivo con ELISA incluyó 174 niños (Nakabayashi M et al., Pediatr Res 2006;60:770-774, datos corregidos para el patrón de ELISA recalibrado). 122 de los niños tenían fiebre aguda (infección respiratoria y/o gastroenteritis) y había 52 controles de edades equivalentes. El valor medio de MxA fue de 123,7 ng/ml \pm 83,0 ng/ml en 95 infecciones víricas confirmadas. El valor medio de MxA fue de 12,3 ng/ml \pm 10,0 ng/ml en 27 infecciones bacterianas confirmadas. El valor medio de MxA fue de 14,5 ng/ml \pm 11,0 ng/ml en los 52 controles de edades equivalentes. La prueba mostró una especificidad de 92,6 % y una razón de probabilidades positiva de 13,1 para identificar con precisión la infección vírica. Se usó un valor de corte de 36,7 ng/ml de MxA para determinar la infección vírica por ELISA en este estudio.

50 El valor de corte en la prueba ELISA es artificial y se selecciona para discriminar entre positivo y negativo. Por lo tanto, es preferente asignar rutinariamente el 10 % del CV de este valor de corte. En una prueba en el punto de atención, el 100 % de las personas pueden ver visiblemente la línea de prueba a > 40 ng/ml, pero algunas personas pueden ver un resultado positivo en niveles más bajos.

55 La PCR se eleva en presencia de infecciones bacterianas, pero no es específica para un tipo particular de bacteria. La PCR es un indicador inespecífico de la presencia de inflamación aguda y está elevada en presencia de infecciones bacterianas. La PCR es una proteína de fase aguda sintetizada por el hígado. La IL-6 es el mediador principal de la producción de PCR. La infección bacteriana es un estímulo potente de elevación marcada de la PCR. Después del tratamiento con antibióticos, los niveles de PCR disminuyen rápidamente. Las infecciones bacterianas elevan drásticamente los niveles de PCR mientras que los niveles de MxA permanecen bajos. La infección bacteriana es un potente estímulo de la PCR con una marcada elevación en los niveles séricos de PCR que se produce en unas pocas horas. Los niveles de PCR se elevan entre 4 y 6 horas después de la estimulación y alcanzan su punto máximo después de 36 horas. La concentración sérica de PCR normalmente es inferior a 3 mg/l. Con infección o inflamación grave, la PCR puede elevarse por encima de 500 mg/l.

65 La neumonía tiene niveles elevados de PCR sérica (> 10 mg/l). Los niveles séricos de PCR son normalmente mayores de 100 mg/l para la neumonía grave. El 32 % de los pacientes con bacteriemia neumocócica tenían PCR sérica inferior

a 60 mg/l. La PCR sérica no suele elevarse por encima de 10 mg/l en la infección vírica. El adenovirus invasivo y la gripe pueden elevar la PCR a 10-80 mg/l. Muy raramente, los niveles de PCR superan los 60 mg/l en infecciones víricas.

5 El metaanálisis de diez estudios (Aouifi et al., Crit care Med. 2000, 28:3171-6; Hatherill et al., Arch Dis Child 1999: 81: 417-21; Muller et al., Crit Care Med. 2000, 28: 977-83; Penel et al., Rev Med Interne 2001:22: 706-714; Rothenberger et al., Clin Chem Lab Med, 1999, 37: 275-9; Schwarz et al., Crit Care Med 2000, 28: 1828-32; Selberg et al., Crit Care Med 2000, 28: 2793-8; Suprin et al., Intensive Care Med 2000, 26: 1232-8; Ugarte et al., Crit Care Med 1999, 27: 498-504; Viallon et al., Intensive Care Med 2000, 26: 1082-8) que analizaron un valor único para que la PCR sérica se usara como valor de corte para la enfermedad bacteriana dio como resultado un resultado bimodal. Tres de los
10 estudios (Aouifi et al., Crit care Med. 2000, 28:3171-6; Penel et al., Rev Med Interne 2001:22: 706-714; Schwarz et al., Crit Care Med 2000, 28: 1828-32) recomendaron que el valor de corte de la PCR se establezca a 6-15 mg/l, mientras que los otros siete estudios (Hatherill et al., Arch Dis Child 1999: 81: 417-21; Muller et al., Crit Care Med. 2000, 28: 977-83; Rothenberger et al., Clin Chem Lab Med, 1999, 37: 275-9; Selberg et al., Crit Care Med 2000, 28: 2793-8; Suprin et al., Intensive Care Med 2000, 26: 1232-8; Ugarte et al., Crit Care Med 1999, 27: 498-504; Viallon et al., Intensive Care Med 2000, 26: 1082-8) recomendaron un valor de corte de 60-100 mg/l.

Aisladamente, ni MxA ni PCR por sí solos son sensibles o específicas para identificar infecciones víricas y bacterianas. Los valores de corte bajos de la PCR muestran una alta sensibilidad y baja especificidad para detectar la infección bacteriana. Los valores de corte altos de PCR muestran baja sensibilidad y alta especificidad para detectar infección bacteriana. MxA es específica para identificar infección vírica, pero no es sensible a la infección bacteriana. Un patrón multiplexado de resultados que incluye puntos de decisión médica reflejaban niveles de corte de PCR bajos, de PCR y MxA altos juntos proporcionan una forma sensible y específica de identificar una respuesta inmunitaria a una infección vírica y/o bacteriana.

25 En una realización preferida de un inmunoensayo de flujo lateral multiplexado, el patrón de sangre de la punción en los dedos de los resultados de la prueba muestra un resultado positivo con una equivalencia sérica con un nivel de corte bajo de PCR de aproximadamente 10 mg/l, una equivalencia sérica con un valor de corte del nivel alto de PCR de aproximadamente 80 mg/l, y un valor de corte de MxA de aproximadamente 40 ng/ml. Estos valores preferidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Biomarcador	Localización	Valor de corte en la punción digital
MxA	Intracelular (células mononucleares de sangre periférica)	40 ng/ml
PCR-bajo	Extracelular (suero)	7 mg/l
PCR-alto	Extracelular (suero)	80 mg/l

35 La especificidad de la prueba se mejora aún más al restringir el uso previsto. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, solo se evalúan ciertas edades de la población de pacientes (preferentemente de un año de edad o más) y/o pacientes con condiciones subyacentes específicas que pueden conducir a factores de confusión, preferentemente no se les realiza esta prueba.

40 Se desarrolló un inmunoensayo de MxA rápido en el punto de atención y se comparó con el ELISA de MxA en 25 muestras de sangre periférica de pacientes con una enfermedad respiratoria febril, como se muestra en la Tabla 6. La Tabla 7 clasifica los mismos datos de menor a mayor cantidad de MxA en la prueba ELISA.

45 El valor de corte del ELISA de MxA fue 36,7 ng/ml (+/- 10 % del CV = 33 ng/ml a 40/5 ng/ml). El paciente 19 tuvo un resultado positivo en la prueba rápida en el punto de atención de MxA, a pesar de que los resultados del ELISA fueron mucho menores que 40 ng/ml (15 ng/ml). Sin embargo, el inmunoensayo de MxA demostró una sensibilidad del 100 % (9/9) y una especificidad del 94 % (15/16).

Tabla 6

Número	Prueba rápida de MxA (40 ng/ml)	EIA de MxA
1	Negativa	32,9
2	Negativa	5,9
3	Negativa	18,8
4	Negativa	5,9
5	Negativa	19,2
6	Negativa	0,0
7	Negativa	6,0
8	Negativa	4,0

(continuación)

Número	Prueba rápida de MxA (40 ng/ml)	EIA de MxA
9	Negativa	7,0
10	Positiva	42,0
11	Negativa	21,3
12	Positiva	49,0
13	Positiva	58,1
14	Negativa	7,3
15	Negativa	3,8
16	Negativa	15,0
17	Negativa	0,0
18	Positiva	47,2
19	Positiva	15,9
20	Positiva	89,5
21	Positiva	67,4
22	Negativa	19,4
23	Positiva	36,0
24	Positiva	57,0
25	Positiva	47,6

Tabla 7

Número	Prueba rápida de MxA (40 ng/ml)	EIA de MxA
15/16	Negativa	0,0
	Negativa	0,0
	Negativa	3,8
	Negativa	4,0
	Negativa	5,9
	Negativa	5,9
	Negativa	6,0
	Negativa	7,0
	Negativa	7,3
	Positiva	15,0
	Negativa	15,9
	Negativa	18,8
	Negativa	19,2
	Negativa	19,4
	Negativa	21,3
Negativa	32,9	
9/9	Positiva	36,0
	Positiva	42,0
	Positiva	47,2
	Positiva	47,6
	Positiva	49,0
	Positiva	57,0
	Positiva	58,1
	Positiva	67,4
Positiva	89,5	

5 Se desarrollaron inmunoensayos de nivel alto de PCR y de nivel bajo de PCR en el punto de atención y se comparó con el ELISA de PCR en 25 muestras de sangre periférica de pacientes con una enfermedad respiratoria febril. Estos pacientes son los mismos pacientes que SE evaluados para MxA en las Tablas 6 y 7. Los resultados se muestran en

la Tabla 8.

Tabla 8

Número	Prueba rápida de PCR ALTA (80 mg/l)	Prueba rápida de PCR BAJA (10 mg/l)	EIA de PCR
1	Negativa	Positiva	10,8
2	Negativa	Positiva	45,1
3	Negativa	Positiva	56,0
4	Negativa	Positiva	37,6
5	Negativa	Positiva	27,8
6	Positiva	Positiva	67,0
7	Negativa	Positiva	16,2
8	Positiva	Positiva	59,0
9	Negativa	Negativa	40,7
10	Negativa	Positiva	43,0
11	Negativa	Positiva	13,3
12	Negativa	Positiva	6,2
13	Negativa	Positiva	16,1
14	Negativa	Positiva	36,2
15	Negativa	Positiva	28,4
16	Negativa	Positiva	11,4
17	Positiva	Positiva	110,0
18	Negativa	Positiva	43,7
19	Negativa	Positiva	15,3
20	Positiva	Positiva	110,0
21	Negativa	Positiva	44,0
22	Negativa	Positiva	20,0
23	Negativa	Positiva	80,0
24	Negativa	Positiva	28,0
25	Negativa	Positiva	32,0

5 Los pacientes número 6 y 8 mostraron un resultado positivo de PCR a pesar de que los resultados de ELISA fueron inferiores a 80 mg/l. El paciente 23 mostró un resultado negativo a pesar de que los resultados del ELISA fueron exactamente 80 mg/l. El paciente número 9 mostró un resultado negativo bajo de la prueba de PCR a pesar de que los resultados del ELISA para ese paciente fueron superiores a 10 mg/l. Pero, en su conjunto, los valores de la PCR se correlacionaron bien con el ELISA de la PCR en ambos valores de corte.

10 Usando un ELISA de MxA y PCR, el RPS analizó 25 muestras del banco de sangre normales y sanas para la presencia o ausencia de niveles elevados de MxA y PCR. Se demostró que la concentración promedio de PCR en plasma era 1,6 mg/l. Se demostró que los niveles de PCR oscilaban entre 0,1 y 3,7 mg/l. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

15

Tabla 9

Muestra	Concentración de MxA en el ELISA (ng/ml)	Concentración de PCR en el ELISA (mg/l)	Prueba rápida de MxA
1	0	1,8	-
2	0	1,5	-
3	0	1,0	-
4	0	1,8	-
5	0	3,0	-
6	0	0,8	-
7	0	2,9	-
8	0	0,8	-
9	0	1,5	-

(continuación)

Muestra	Concentración de MxA en el ELISA (ng/ml)	Concentración de PCR en el ELISA (mg/l)	Prueba rápida de MxA
10	0	0,2	-
11	0	1,5	-
12	0	1,2	-
13	0	3,7	-
14	0	0,1	-
15	0	0,4	-
16	0	2,3	-
17	0	2,4	-
18	0	3,1	-
19	0	0,9	-
20	0	0,5	-
21	0	2,3	-
22	11,631	1,8	-
23	0	1,7	-
24	0	3,2	-
25	0	0,5	-

Las tiras reactivas bimodales dobles se pueden usar para diferenciar la infección bacteriana y vírica en seres humanos, pero también pueden usarse en aplicaciones veterinarias para animales. Dado que la PCR difiere según la especie, no hay anticuerpos comunes contra la PCR entre especies. Por lo tanto, las pruebas veterinarias deben incluir PCR específica para la especie particular que se está evaluando. MxA está bien conservada entre especies, por lo tanto, es posible utilizar MxA humana en pruebas veterinarias. Sin embargo, MxA para una especie particular podría usarse alternativamente para tratar de aumentar aún más la especificidad. Las pruebas veterinarias que usan las tiras reactivas bimodales dobles descritas en el presente documento pueden desarrollarse para una especie específica, incluyendo, pero sin limitación, gatos, perros, conejos, cerdos, oveja, caballos, vacas, monos, chimpancés, babuínos y orangutanes.

La tira con MxA y PCR baja podría hacerse con cualquier configuración, por ejemplo, las configuraciones mostradas en las Figuras 4A y 4B, o las Figuras 5A a 5D, en la que MxA es el marcador vírico que se detecta y los niveles relativamente bajos de PCR es el marcador bacteriano que se detecta. En otras realizaciones, la línea de prueba de MxA y la línea de prueba de PCR podrían superponerse o estar en la misma localización en la tira reactiva. En estas realizaciones, la presencia de niveles bajos de PCR y MxA en la misma línea de prueba tiene características diferentes que la presencia de un marcador bacteriano o vírico solo. Por ejemplo, la presencia de niveles bajos de PCR y MxA en la misma línea de prueba puede indicarse visualmente mediante un color diferente al de la presencia de MxA o PCR baja por separado. En estas realizaciones, un resultado positivo para MxA daría un color o indicación diferente que un resultado positivo para PCR baja, para que la persona que lee el ensayo pueda distinguir entre un resultado completamente negativo, un resultado positivo para MxA, un resultado positivo para PCR baja y un resultado positivo para MxA y PCR baja. Por ejemplo, un resultado positivo para MxA podría dar como resultado una línea de prueba roja y un resultado positivo para una PCR baja podría dar como resultado una línea de prueba azul. Por tanto, cuando una muestra es positiva tanto para MxA como para PCR bajo, la línea es visiblemente púrpura.

Algunas realizaciones para dispositivos de ensayo de flujo lateral para detectar niveles altos de PCR se muestran en las Figuras 6A-6B y 7A-7D. Estas configuraciones son similares a las configuraciones mostradas en las Figuras 4A-4B y 5A-5D, sin una línea de prueba para un marcador vírico y se usan los mismos números de referencia para los mismos componentes de la tira (600), (700).

Las Figuras 6A y 6B muestran una tira reactiva cromatográfica (600) con una línea de prueba (623) que detecta la presencia de un marcador bacteriano, tales como niveles altos de PCR. La muestra se aplica a la zona de aplicación (401) de la tira reactiva cromatográfica (600). Como se muestra en la Figura 6A, a continuación, la muestra pasa a una zona de reactivos (660) que contiene al menos un compañero de unión bacteriano marcado que se eluye y luego puede migrar con un líquido de transporte de la muestra (por ejemplo, una solución tampón). Como alternativa, como se muestra en la Figura 6B, la zona de reactivos (660) se encuentra aguas arriba de la zona de aplicación de muestras (401) de tal manera que los compañeros de unión marcados en la zona de reactivos son eluidos por el líquido de transporte de la muestra y viajan a la muestra. El compañero de unión bacteriano marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés, por ejemplo, niveles altos de PCR, para formar un complejo que, a su vez, es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o compañero 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, pero sin limitación, una zona de residuos, un respaldo del soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para leer el resultado, opcionalmente también puede ser un componente de la tira reactiva (600) en estas realizaciones.

- 5 La tira reactiva (600) también incluye una zona de detección (605) que contiene una sección para la detección de un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (623), que incluye un compañero de unión específico inmovilizado, complementario al complejo de reactivo bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por tanto, en la línea de prueba (623), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan a los compañeros de unión bacterianos marcados de la zona de reactivos (660) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización del marcador bacteriano con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (623). En la línea de prueba (623), la presencia del marcador bacteriano se determina mediante la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (623) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.
- 10
- 15 Opcionalmente, la zona de detección (605) puede contener más líneas de prueba para detectar otros marcadores bacterianos y/o víricos, así como una línea de control (404). La línea de control (404) indica que el compañero de unión específica marcado ha viajado a lo largo del ensayo, a pesar de que puede no haber unido ningún marcador bacteriano, confirmando así el correcto funcionamiento del ensayo. Como se muestra en las Figuras 6A a 6B, la zona de control (404) está, preferentemente, aguas abajo de la línea de prueba (623). Sin embargo, en otras realizaciones, la zona de control (404) puede ubicarse aguas arriba de la línea de prueba (623).
- 20

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

25

En otras realizaciones preferidas para analizar un marcador bacteriano, tal como niveles altos de PCR, como se muestra en las Figuras 7A a 7D, la muestra pasa a una zona de lisis (250), en la que, preferentemente, un agente de lisis se habrá cargado previamente en la tira reactiva y el líquido de transporte lo eluirá. El agente de lisis lisa cualquier componente susceptible a la lisis en la muestra *in situ*.

30

La tira reactiva cromatográfica (700) contiene una zona de aplicación de muestras (201), una zona de lisis (250) que contiene un agente de lisis y una zona de reactivos (760) que contiene al menos un compañero de unión marcado que se une a un marcador bacteriano, por ejemplo, niveles altos de PCR, que se eluye y luego puede migrar con un líquido de transporte de la muestra (por ejemplo, una solución tampón). Aunque que la zona de reactivos (760) se muestra aguas abajo de la zona de aplicación de muestras en estas figuras, en realizaciones alternativas, la zona de reactivos (760) podría estar aguas arriba de la zona de aplicación de muestras (véase la Figura 6B), siempre que los reactivos encuentren la muestra en algún momento después de que la muestra alcance la zona de lisis y se lise de manera efectiva. El compañero de unión marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés, por ejemplo, niveles altos de PCR, para formar un complejo que, a su vez, es capaz de unirse específicamente a otro reactivo específico o compañero 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, pero sin limitación, una zona de residuos, un respaldo del soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para leer el resultado, opcionalmente también puede ser un componente de la tira reactiva (700) en estas realizaciones.

35

40

45

En una realización preferida, el agente de lisis se localiza en la zona de lisis (250) entre la zona de aplicación de muestras (201) y la zona de reactivos (760). El agente de lisis es, preferentemente, soluble o miscible en el líquido de transporte de la muestra, y el agente de lisis se solubiliza y se activa al entrar en contacto con el líquido de transporte de la muestra. El líquido de transporte de la muestra contiene tanto el agente de lisis en solución o suspensión como los componentes de la muestra en suspensión. Cualquier componente susceptible a la lisis en una muestra, tras estar expuesto en suspensión al agente de lisis, están lisados *in situ*. Así, el tampón de carrera transporta la muestra, incluyendo cualquier componente liberado por lisis, a la zona de detección (705).

50

La zona de lisis (250) se encuentra, preferentemente, entre la zona de aplicación de muestras (201) y la zona de reactivos (760), como se muestra en la Figura 7A. En otras realizaciones, la zona de lisis (250) se superpone a la zona de aplicación de muestras (201), la zona de reactivos (760) o la zona de aplicación de muestras (201) y la zona de reactivos (260) como se muestra en las Figuras 7B, 7C y 7D, respectivamente. Cabe destacar que las figuras son esquemáticas y no están dibujadas a escala. La cantidad de superposición entre las diferentes zonas (como se muestra en las Figuras 7B a 7D) puede ser muy variable.

55

60

La tira reactiva (700) también incluye una zona de detección (705) que contiene una sección para la detección de al menos un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (723), que incluye un compañero de unión específico inmovilizado, por ejemplo, un compañero de unión específico para un nivel alto de PCR, complementario al conjugado bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por tanto, en la línea de prueba (723), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan a los compañeros de unión marcados bacterianos de

65

la zona de reactivos (760) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización de los marcadores bacterianos con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (723). En la línea de prueba (723), la presencia de un marcador bacteriano se determina mediante la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (723) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.

5 Opcionalmente, la zona de detección (705) puede contener más líneas de prueba para detectar otros marcadores bacterianos y/o víricos, así como una línea de control (204). La línea de control (204) indica que el compañero de unión específica marcado ha viajado a lo largo del ensayo, aunque no haya unido ningún marcador, confirmando así el correcto funcionamiento del ensayo. Como se muestra en las Figuras 7A a 7D, la zona de control (204) está, preferentemente, aguas abajo de la línea de prueba (723). Sin embargo, en otras realizaciones, la zona de control (204) puede ubicarse aguas arriba de la línea de prueba (723).

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

20 En las Figuras 8A a 8C se muestra una configuración preferida para un dispositivo de análisis de muestras de tiras reactivas dobles bimodal. El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta de prueba (800) incluye una carcasa que se puede cerrar (835) con dos lados (836), (837) y una columna vertebral o porción articulada (831). En una realización preferida, la tarjeta de prueba (800) mide aproximadamente 11,5 cm de largo (L) x 7 cm de ancho (W) cuando los dos lados (836), (837) se cierran. Sin embargo, se puede usar una tarjeta de prueba de cualquier tamaño (800) que acomode todos los componentes. Dentro del primer lado (836) de la carcasa (835), hay dos tiras reactivas (815), (825), incluyendo cada una una almohadilla receptora (845), una zona de desviación (850), una almohadilla de transferencia (855) y una zona de detección (805). El primer lado (836) también incluye una almohadilla absorbente (840) y, preferentemente, una almohadilla de desechos (860). La primera tira reactiva (815) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba de MxA (802), una línea de prueba de PCR bajo (803) y una línea de control (804). La segunda tira reactiva (825) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba de PCR alta (823) y una línea de control (804). Todas las líneas de prueba son visibles a través de las ventanas (865) en el segundo lado (837) de la carcasa (835) cuando la carcasa (835) está cerrada. La almohadilla absorbente (840) es, preferentemente, una almohadilla única a la que se añade tampón de carrera para iniciar el flujo lateral. De manera similar, la almohadilla de desechos (860) es, preferentemente, una almohadilla única que recoge el exceso de tampón de carrera al final de la prueba. Sin embargo, en otras realizaciones, cada tira podría tener una almohadilla absorbente separada (840) y/o una almohadilla de desechos (860).

40 El segundo lado (837) de la carcasa (835) incluye tres secciones separadas (838), (839) y (870). La porción del medio, un compresor o aleta de muestras (870), preferentemente incluye dos zonas conjugadas (872), (874), cada una de las cuales incluye un compañero de unión marcado para al menos un analito, y un control marcado. Una ventana (843) está localizada en la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa para que el tampón se pueda añadir a la almohadilla absorbente (840) cuando la carcasa (835) está cerrada. Las ventanas de visualización (865) para las zonas de detección (805) están en la parte superior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835).

45 La porción superior (839) y la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa (835) también incluyen, preferentemente, cada una al menos una perilla, clavija o saliente (875) que se acopla con uno o más orificios (895) de modo que las porciones superior e inferior (838), (839) se pueden fijar fácilmente en el primer lado (836) de la carcasa (835). En una realización preferida, hay dos clavijas (875) en la porción inferior (838) que se acoplan con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla absorbente (840) en el primer lado (836) de la carcasa (835) y dos clavijas (875) en la porción superior (839) que se acoplan con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla de desechos (860) en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones, los orificios (895) están en el segundo lado (837) de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones más, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la porción superior (838) y/o la porción inferior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) al primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones, las secciones superior e inferior (838), (839) se cierran permanentemente, por ejemplo usando un adhesivo, antes de su uso.

60 La aleta (870), también conocida como compresor de muestras, en el segundo lado (837) de la carcasa incluye dos zonas conjugadas (872), (874) y dos zonas de aplicación de muestras (873), (876) y se pueden abrir y cerrar fácilmente. La aleta (870) también incluye, preferentemente, al menos una perilla, clavija o protuberancia (875) que se acopla con uno o más orificios (895) para que la aleta (870) se cierre fácilmente correctamente en el primer lado (836) de la carcasa (835) después de que la muestra se haya añadido a las zonas de aplicación de muestras (873), (876). En otras realizaciones, los orificios (895) están en el segundo lado (837) de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones más, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la aleta (870) al primer lado (836) de la carcasa (835).

65 Las zonas conjugadas (872), (874) y las zonas de aplicación de muestras (873), (876) preferentemente, se solapan.

- En realizaciones preferidas, las zonas conjugadas (872), (874) se colorean debido a los colorantes en los conjugados de muestra y conjugados de control, y la muestra se coloca directamente en la porción coloreada de la aleta (870). En una realización preferida, la zona conjugada (872) que se usa para la primera tira reactiva (815) contiene un compañero de unión de MxA que está marcado con un colorante rojo, un compañero de unión de PCR baja que está marcado con un colorante negro y un compañero de unión de control que está marcado con un colorante azul. En esta realización, la zona conjugada (872) aparece púrpura. La otra zona conjugada (874) contiene un compañero de unión de PCR alta que está marcado con un colorante negro y un compañero de unión de control que está marcado con un colorante azul. En esta realización, la zona conjugada (874) aparece azulada.
- La zona de desviación (850) incluye, preferentemente, un hueco o barrera que interrumpe el flujo lateral, desviando el tampón de carrera hacia la aleta (870) que incluye las zonas conjugadas (872), (874) y las zonas de aplicación de muestras (873), (876).
- En funcionamiento, las porciones superior e inferior (838), (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) se cierran preferentemente antes de su uso asegurando las clavijas (875) a los orificios (895). El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta de prueba (800) se coloca, preferentemente, sobre una superficie plana. Si la aleta (870) aún no está abierta, el usuario la abre para acceder a las zonas de aplicación de muestras (873), (876). Se toma una muestra de sangre para analizar del paciente. La muestra puede tomarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización preferida, se añade una muestra de 5 µl de sangre a cada una de las zonas de aplicación de muestras (873), (876) y luego se cierra la aleta (870). Cada una de las muestras de 5 µl se recoge, preferentemente, independientemente una de la otra. Las muestras de sangre se añaden, preferentemente, directamente al dispositivo (800), sin ningún tratamiento previo.
- Para asegurarse de que el compresor o aleta de muestras (870) se haya cerrado correctamente, la presión se aplica preferentemente a la carcasa (835) por encima de las clavijas (875) para cerrar las clavijas (875). La parte superior de la aleta (870) debe estar al ras de la parte superior del resto del segundo lado (837) de la carcasa (835) para que la prueba se realiza correctamente. Se añade tampón de carrera a la almohadilla absorbente (840), que inicia el flujo lateral (885). En realizaciones preferidas, el tampón de carrera incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer la MxA intracelular en la muestra. Cuando el tampón de carrera alcanza la zona de desviación (850), se desvía hacia la aleta (870). Viaja a través de las zonas conjugadas (872), (874), recogiendo cualquier complejo formado entre el compañero de unión de MxA y MxA en la muestra, el compañero de unión a PCR baja y los niveles altos de PCR en la muestra, el compañero de unión a PCR alta los niveles altos de PCR en la muestra, así como el conjugado de control.
- Desde las zonas conjugadas (872), (874) unen la zona de desviación (850) en las tiras reactivas de flujo lateral (815), (825), el tampón de carrera, que ahora contiene muestra, el conjugado y los complejos descritos anteriormente, luego viaja a la almohadilla de transferencia (855) y a las zonas de detección (805) en cada una de las tiras reactivas (815), (825). Si MxA está presente en la muestra, la línea de prueba de MxA (802) en la primera tira reactiva (815) será roja. Si hay un nivel bajo umbral de PCR presente en la muestra, la línea de prueba de PCR baja (803) en la primera tira reactiva (815) será negra. Si hay un nivel alto umbral de PCR presente en la muestra, la línea de prueba de PCR alta (823) en la segunda tira reactiva (825) será negra. Si la prueba se ejecuta correctamente, las líneas de control (804) tanto en la primera tira (815) como en la segunda tira reactiva (825) serán azules. En realizaciones preferidas, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para PCR baja en la primera tira reactiva (815) y 80 mg/l para PCR alta en la segunda tira reactiva (825). Los resultados de la prueba deben ser visibles después de aproximadamente 5-20 minutos, preferentemente en un plazo de aproximadamente 10 minutos.
- Dado que el compañero de unión de control está en el compresor o aleta de muestras (870) y no en ninguna de las tiras reactivas (815), (825), hay un verdadero control de procedimiento para esta configuración. Si la aleta (870) no se cierra correctamente, no aparecerá nada en la zona de detección (805), lo que indica que la prueba se realizó incorrectamente.
- Las Figuras 9A a 9F muestran los resultados de la prueba usando el dispositivo (800) que se muestra en las Figuras 8A a 8C, con dos tiras reactivas (815), (825) lado a lado, donde una primera tira reactiva (815) analiza la presencia de MxA y niveles bajos de PCR y la segunda tira reactiva (825) analiza niveles altos de PCR.
- La Figura 9A muestra un resultado negativo en la línea de prueba de MxA (802) y un resultado negativo en la línea de prueba de PCR baja (803) en la primera tira reactiva (815), así como un resultado negativo en la línea de prueba de PCR alta (823) en la segunda tira reactiva (825). Más específicamente, las únicas líneas visibles en la zona de detección (805) del ensayo de flujo lateral (800) son las dos líneas de control azules (804). Este resultado indica que la muestra es negativa tanto para la infección vírica como bacteriana.
- Las Figuras 9B y 9C son positivas para infección vírica. En la figura 9B, la presencia de dos líneas de control azules (804) y una línea roja de MxA (802) indican una infección vírica. En la figura 8C, la presencia de dos líneas de control azules (804) y una línea roja de MxA (802) indican una infección vírica. Como también hay una línea negra de PCR baja (803) en la Figura 9C, existe la posibilidad de coinfección bacteriana, aunque hay una ausencia de una línea de PCR alta (823).

Las Figuras 9D y 9E son positivas para infección bacteriana. En la figura 9D, la presencia de dos líneas de control azules (804) y una línea negra de PCR baja (803) indica una infección bacteriana. En la figura 9E, la presencia de dos líneas de control azules (804), una línea negra de PCR baja (803) y una línea negra de PCR alta (823) también indica una infección bacteriana. La línea de MxA está ausente en las figuras 9D y 9E, lo que indica ausencia de una infección vírica.

La Figura 9F indica coinfección (infección bacteriana y vírica). La presencia de dos líneas de control azules (804), una línea roja de MxA (802), una línea negra de PCR baja (803) y una línea negra de PCR alta (823) indica la presencia de infección vírica y bacteriana.

Otra configuración preferida para un dispositivo bimodal de análisis de muestras de tira reactiva doble (1000) se muestra en las Figuras 10A a 10C. Esta configuración es similar a la configuración (800) que se muestra en las Figuras 8A a 8C, pero las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076) se encuentran en cada una de las tiras reactivas (1015), (1025), aguas abajo de la zona de desviación (850). El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta de prueba (1000) incluye una carcasa que se puede cerrar (835) con dos lados (836), (837) y una columna vertebral o porción articulada (831). En una realización preferida, la tarjeta de prueba (1000) mide aproximadamente 11,5 cm de largo (L) x 7 cm de ancho (W) cuando los dos lados (836), (837) se cierran. Sin embargo, se puede usar una tarjeta de prueba de cualquier tamaño (1000) que acomode todos los componentes. Dentro del primer lado (836) de la carcasa (835), hay dos tiras reactivas (1015), (1025), incluyendo cada una una almohadilla receptora (845), una zona de desviación (850), una almohadilla de transferencia (1055) y una zona de detección (805). El primer lado (836) también incluye una almohadilla absorbente (840) y, preferentemente, una almohadilla de desechos (860). La primera tira reactiva (1015) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba de MxA (802), una línea de prueba de PCR bajo (803) y una línea de control (804). La segunda tira reactiva (1025) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba de PCR alta (823) y una línea de control (804). Todas las líneas de prueba son visibles a través de las ventanas (865) en el segundo lado (837) de la carcasa (835) cuando la carcasa (835) está cerrada. La almohadilla absorbente (840) es, preferentemente, una almohadilla única a la que se añade el tampón de carrera para iniciar el flujo lateral. De manera similar, la almohadilla de desechos (860) es, preferentemente, una almohadilla única que recoge el exceso de tampón de carrera al final de la prueba. Sin embargo, en otras realizaciones, cada tira podría tener una almohadilla absorbente separada (840) y/o una almohadilla de desechos (860).

El segundo lado (837) de la carcasa (835) incluye tres secciones separadas (838), (839) y (1070). La porción central, o aleta (1070), también conocida como compresor de muestras, incluye, preferentemente, dos zonas conjugadas (872), (874), cada una de las cuales incluye un compañero de unión marcado para al menos un analito, y un control marcado. Una ventana (843) está localizada en la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa para que se pueda añadir el tampón cuando la carcasa (835) está cerrada. Las ventanas de visualización (865) para las zonas de detección (805) están en la parte superior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835).

La porción superior (839) y la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa (835) también incluyen, preferentemente, cada una al menos una perilla, clavija o saliente (875) que se acopla con uno o más orificios (895) de modo que las porciones superior e inferior (838), (839) se pueden fijar fácilmente en el primer lado (836) de la carcasa (835). En una realización preferida, hay dos clavijas (875) en la porción inferior (838) que se acoplan con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla absorbente (840) en el primer lado (836) de la carcasa (835) y dos clavijas (875) en la porción superior (839) que se acoplan con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla de desechos (860) en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones, los orificios (895) están en el segundo lado (837) de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones más, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la porción superior (838) y/o la porción inferior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) al primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones, las secciones superior e inferior (838), (839) se cierran permanentemente, por ejemplo usando un adhesivo, antes de su uso.

La aleta (1070) en el segundo lado (837) de la carcasa incluye dos zonas conjugadas (872), (874) y se puede abrir y cerrar fácilmente. La aleta (1070) también incluye, preferentemente, al menos una perilla, clavija o protuberancia (875) que se acopla con uno o más orificios (895) para que la aleta (1070) se cierre fácilmente correctamente en el primer lado (836) de la carcasa (835) después de que la muestra se haya añadido a las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076) en las tiras reactivas (1015), (1025). En otras realizaciones, los orificios (895) están en el segundo lado (837) de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otras realizaciones más, se podrían usar otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la aleta (1070) al primer lado (836) de la carcasa (835).

En realizaciones preferidas, las zonas conjugadas (872), (874) se colorean debido a los colorantes en los conjugados de muestra y los conjugados de control. En una realización preferida, la zona conjugada (872) que se usa para la primera tira reactiva (1015) contiene un compañero de unión de MxA que está marcado con un colorante rojo, un compañero de unión de PCR baja que está marcado con un colorante negro y un compañero de unión de control que está marcado con un colorante azul. En esta realización, la zona conjugada (872) aparece púrpura. La otra zona

conjugada (874) contiene un compañero de unión de PCR alta que está marcado con un colorante negro y un compañero de unión de control que está marcado con un colorante azul. En esta realización, la zona conjugada (874) aparece azulada.

- 5 La zona de desviación (850), que preferentemente incluye un hueco o barrera, interrumpe el flujo lateral, desviando el tampón de carrera hacia la aleta (1070) que incluye las zonas conjugadas (872), (874).

10 En funcionamiento, las porciones superior e inferior (838), (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) se cierran preferentemente antes de su uso asegurando las clavijas (875) a los orificios (895). El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta de prueba (1000) se coloca, preferentemente, sobre una superficie plana. Si la aleta (1070) aún no está abierta, el usuario la abre para acceder a las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076). Las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076) pueden localizarse en cualquier parte de la almohadilla de transferencia (1055). Se toma una muestra de sangre para analizar del paciente. La muestra puede tomarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización preferida, se añade una muestra de 5 µl de sangre a cada una de las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076) y luego la aleta (1070) se cierra. Cada una de las muestras de 5 µl se recoge, preferentemente, independientemente una de la otra. La sangre se añade, preferentemente, directamente al dispositivo (1000), sin ningún tratamiento previo. En realizaciones preferidas, una flecha (1002) u otra indicación (que se muestra en la Figura 10A), por ejemplo, las palabras "añadir muestra aquí" le muestran al usuario dónde colocar la muestra en las tiras reactivas (1015), (1025).

20 Para asegurarse de que la aleta (1070) se haya cerrado correctamente, la presión se aplica preferentemente a la carcasa (835) por encima de las clavijas (875) para cerrar las clavijas (875). La parte superior de la aleta (1070) debe estar al ras de la parte superior del resto del segundo lado (837) de la carcasa (835) para que la prueba se realiza correctamente. Se añade tampón de carrera a la almohadilla absorbente (840), que inicia el flujo lateral (885). En realizaciones preferidas, el tampón de carrera incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer la MxA intracelular en la muestra. Cuando el tampón de carrera alcanza la zona de desviación (850), se desvía hacia la aleta (1070). Viaja a través de las zonas conjugadas (872), (874), recogiendo los compañeros de unión de MxA, los compañeros de unión de PCR baja y los compañeros de unión de PCR alta, así como el conjugado de control.

30 Desde las zonas conjugadas (872), (874) unen la zona de desviación (850) en las tiras reactivas de flujo lateral (1015), (1025), el tampón de carrera, que ahora contiene conjugado, luego viaja a la almohadilla de transferencia (1055), que incluye las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076), y a las zonas de detección (805) en cada una de las tiras reactivas (1015), (1025). Si MxA está presente en la muestra, la línea de prueba de MxA (802) en la primera tira reactiva (1015) será roja. Si hay un nivel bajo umbral de PCR presente en la muestra, la línea de prueba de PCR baja (803) en la primera tira reactiva (1015) será negra. Si hay un nivel alto umbral de PCR presente en la muestra, la línea de prueba de PCR alta (823) en la segunda tira reactiva (1025) será negra. En realizaciones preferidas, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para PCR baja en la primera tira reactiva (1015) y 80 mg/l para PCR alta en la segunda tira reactiva (1025). Los resultados de la prueba deben ser visibles después de aproximadamente 5-20 minutos, preferentemente en un plazo de aproximadamente 10 minutos. Si la prueba se ejecutó correctamente, las líneas de control (804) tanto en la primera tira (815) como en la segunda tira reactiva (825) serán azules.

45 Como el compañero de unión de control está en la aleta (1070) y no en ninguna de las tiras reactivas (1015), (1025), hay un verdadero control de procedimiento para esta configuración. Si la aleta (1070) no se cierra correctamente, no aparecerá nada en la zona de detección (805), lo que indica que la prueba se realizó incorrectamente.

50 En una realización alternativa, las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076) se encuentran en la almohadilla receptora (845), antes de la zona de desviación (850). En esta realización, el tampón de carrera viaja a través de las zonas de aplicación de muestras (1073), (1076), y luego se desvía hacia la aleta (1070).

55 En realizaciones preferidas de las configuraciones mostradas en las Figuras 8A a 8C y 10A a 10C, se colocan más de aproximadamente 1,2 ml de tampón de carrera sobre la almohadilla absorbente (840). Si se añade menos de 1,0 ml en realizaciones en las que la zona de desviación (850) es un hueco, el tampón se estanca en el hueco porque el hueco contiene aproximadamente 1,0 ml.

60 Como se muestra en la Figura 11, en una realización preferida, un kit (1100) incluye el dispositivo de análisis de muestras (800), (1000), una lanceta (1102), una o más pipetas (1101) y un tampón de carrera (1103). La lanceta (1102) se usa para hacer una punción en la piel y una o más pipetas (1101) se usan para recoger la sangre del sitio de punción. En una realización preferida, se transfieren 5 µl de sangre desde una primera pipeta (1101) a la primera zona conjugada (872) y se transfieren otros 5 µl de sangre desde una segunda pipeta (1101) y se añade a la segunda zona conjugada (874). La aleta (870) se cierra y el tampón de carrera (1103) se añade a la almohadilla absorbente (840), como se describe en la descripción de las Figuras 8A a 8C y 10A a 10C.

65 La zona de desviación (850) incluye, preferentemente, al menos una característica que interrumpe el flujo en el plano en el que está ocurriendo el flujo. La zona de desviación puede incluir una barrera, un hueco, una zanja, o cualquier combinación de estas características. La barrera es, preferentemente, una membrana impermeable (o membrana

sustancialmente impermeable) que puede estar hecha de cualquier material que evite que el flujo de líquido continúe fluyendo en el mismo plano. Algunos materiales para la barrera incluyen, pero sin limitación, materiales inertes, materiales semipermeables, plásticos, hidrocarburos, metal, materiales hidrofóbicos, Sefadex, Sefarosa, acetato de celulosa, un material higroscópico (por ejemplo, CaCl_2 , CaSO_4 o gel de sílice), o hidrogeles. El hueco o zanja es cualquier rotura en el plano de la tira reactiva de flujo lateral que se extiende a una profundidad suficiente para detener el flujo. En una realización preferida, el hueco tiene, preferentemente, al menos aproximadamente 0,1 mm de profundidad.

La zona de desviación (850) en las Figuras 8A a 8C y 10A a 10C retrasa o detiene completamente el flujo hasta que la aleta/compresor de muestras (870), (1070) entra en contacto con el resto del dispositivo y crea un puente a lo largo del cual puede fluir el fluido. El compresor de muestras (870), (1070) actúa como un puente y redirige el flujo hacia un plano diferente. El flujo se desvía hacia el compresor de muestras (870), (1070). Esto aumenta la recolección de los reactivos en el compresor de muestras (870), (1070). Por ejemplo, en realizaciones en las que el conjugado está en el compresor de muestras (870), (1070), la recolección del conjugado aumenta en los dispositivos con una zona de desviación (850). En realizaciones donde ambas zonas de aplicación de muestras (873), (876), (1073), (1076) y el conjugado están en el compresor de muestras (870), (1070), la muestra y el conjugado encuentran el tampón de carrera cuando se desvía hacia el compresor de muestras (870), (1070) y se forma un sándwich © o sándwich completo (dependiendo de dónde esté situado el segundo compañero de unión para el analito en el dispositivo de análisis de muestras) antes de que el tampón de carrera se desvíe de nuevo a las tiras reactivas si el analito está presente en la muestra. Realizaciones con una zona de desviación (850) y un compresor de muestras (870), (1070) aumentan la velocidad, permiten mejores interacciones entre el conjugado y la muestra, y permiten una mayor sensibilidad porque se coloca más conjugado en el líquido. En estas realizaciones, todo el fluido interacciona, preferentemente, con el conjugado. Esta es una mejora significativa sobre las realizaciones del compresor sin redirección, donde aproximadamente el 20-30 % del fluido interacciona con el conjugado.

En la Figura 12 se muestra otra configuración preferida para un dispositivo bimodal de análisis de muestras de tira reactiva doble (1200). Esta configuración es similar a las configuraciones (800), (1000) mostradas en las Figuras 8A a 8C y las Figuras 10A a 10C, sin una segunda sección (837) de la carcasa (1235) o una zona de desviación (850). En cambio, todos los componentes de la prueba están situados en el mismo plano y el flujo procede lateralmente desde la almohadilla absorbente (840) hacia la almohadilla de desechos (860). Tenga en cuenta que esta realización también podría incluir una carcasa con una ventana para facilitar la aplicación del tampón a la almohadilla absorbente (840), una ventana situada sobre cada zona de aplicación de muestras (1273), (1276) para aplicar la muestra al dispositivo (1200) y ventanas de visualización para la zona de detección (805). En una realización preferida, el dispositivo de análisis de muestras (1200) mide aproximadamente 11,5 cm de longitud (L) x 7 cm de ancho (W). Sin embargo, se puede usar una tarjeta de prueba de cualquier tamaño (1200) que acomode todos los componentes. Hay dos tiras reactivas (1215), (1225), cada una con una almohadilla receptora (845), una zona conjugada (1272), (1274), una almohadilla de transferencia (1240) que contiene una zona de aplicación de muestras (1273), (1276), una zona de detección (805) y una almohadilla de desechos (860). El dispositivo (1200) también incluye, preferentemente, una almohadilla absorbente (840) y una almohadilla de desechos (860). Mientras que las zonas conjugadas (1272), (1274) se muestran aguas arriba de las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276) en esta figura, en otras realizaciones, una o ambas zonas conjugadas (1272), (1274) se encuentran aguas abajo de las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276). La zona de detección (805) de la primera tira reactiva (1215) incluye, preferentemente, una línea de prueba de MxA (802), una línea de prueba de PCR baja (803) y una línea de control (804). La zona de detección (805) en la segunda tira reactiva (1225) también incluye, preferentemente, una línea de prueba de PCR alta (823) y una línea de control (804). La almohadilla absorbente (840) es, preferentemente, una almohadilla única a la que se añade tampón de carrera para iniciar el flujo lateral. De manera similar, la almohadilla de desechos (860) es, preferentemente, una almohadilla única que recoge el exceso de tampón de carrera al final de la prueba. Sin embargo, en otras realizaciones, cada tira podría tener una almohadilla absorbente separada (840) y/o una almohadilla de desechos (860).

En realizaciones preferidas, las zonas conjugadas (1272), (1274) se colorean debido a los colorantes en los conjugados de muestra y los conjugados de control. En una realización preferida, la zona conjugada (1272) que se usa para la primera tira reactiva (1215) contiene un compañero de unión de MxA que está marcado con un colorante rojo, un compañero de unión de PCR baja que está marcado con un colorante negro y un compañero de unión de control que está marcado con un colorante azul. En esta realización, la zona conjugada (1272) aparece púrpura. La otra zona conjugada (1274) contiene un compañero de unión de PCR alta que está marcado con un colorante negro y un compañero de unión de control que está marcado con un colorante azul. En esta realización, la zona conjugada (1274) aparece azulada.

En funcionamiento, se toma una muestra de sangre para analizar del paciente. La muestra puede tomarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización preferida, se añade una muestra de 5 μl de sangre a cada una de las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276). Cada una de las muestras de 5 μl se recoge, preferentemente, independientemente una de la otra. En realizaciones preferidas, una flecha (1002) u otra indicación (que se muestra en la Figura 10A), por ejemplo, las palabras "añadir muestra aquí" le muestran al usuario dónde colocar la muestra en las tiras reactivas (1215), (1225).

La sangre se añade, preferentemente, directamente al dispositivo (1200), sin ningún tratamiento previo. Se añade tampón de carrera a la almohadilla absorbente (840), que inicia el flujo lateral (1285). En realizaciones preferidas, el tampón de carrera incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer la MxA intracelular en la muestra. Viaja a través de las zonas conjugadas (1272), (1274), recogiendo los
 5 compañeros de unión de MxA, los compañeros de unión de PCR baja, los compañeros de unión de PCR alta, así como el conjugado de control.

El tampón de carrera, que ahora contiene conjugado, luego viaja a la almohadilla de transferencia (1255), que incluye las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276), y a las zonas de detección (805) en cada una de las tiras reactivas
 10 (1215), (1225). Si MxA está presente en la muestra, la línea de prueba de MxA (802) en la primera tira reactiva (1215) será roja. Si hay un nivel bajo umbral de PCR presente en la muestra, la línea de prueba de PCR baja (803) en la primera tira reactiva (1215) será negra. Si hay un nivel alto umbral de PCR presente en la muestra, la línea de prueba de PCR alta (823) en la segunda tira reactiva (1225) será negra. En realizaciones preferidas, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para PCR baja en la primera tira reactiva (1215) y 80 mg/l para PCR alta en la segunda
 15 tira reactiva (1225). Los resultados de la prueba deben ser visibles después de aproximadamente 5-20 minutos, preferentemente en un plazo de aproximadamente 10 minutos. Si la prueba se ejecutó correctamente, las líneas de control (804) tanto en la primera tira (1215) como en la segunda tira reactiva (1225) serán azules.

En una realización alternativa, las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276) se encuentran aguas arriba de las zonas conjugadas (1272), (1274). En esta realización, el tampón de carrera viaja a través de las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276) y, a continuación, a las zonas conjugadas (1272), (1274). En aún otras realizaciones, las zonas conjugadas (1272), (1274) solapan las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276). En aún otras realizaciones, las zonas conjugadas (1272), (1274) y/o las zonas de aplicación de muestras (1273), (1276) pueden estar localizadas en la almohadilla receptora (845).
 20

En realizaciones preferidas de las configuraciones mostradas en las Figuras 4A a 8C, 10A a 10C y 12, el control es conejo anti-pollo y el conjugado de control es perlas de látex azul acopladas a IgY de pollo, En otras realizaciones preferidas, hay al menos un agente de lisis, preferentemente un detergente, en el tampón de carrera.
 25

30 Detección simultánea de proteínas intracelulares y extracelulares

Hay analitos extracelulares y hay analitos intracelulares. La detección de cada uno es a menudo un evento separado. El analito intracelular debe extraerse mediante lisis de las células para que el analito internalizado se externalice y esté disponible para su análisis.
 35

Los métodos desvelados en el presente documento detectan simultáneamente al menos un analito extracelular y al menos un analito intracelular. Un objetivo o analito "intracelular", como se describe en esta realización, es un analito que está dentro de una célula y no toca nada dentro de la célula (como las proteínas de la superficie, la pared celular o las superficies internas). Un objetivo o analito "extracelular", como se describe en esta realización, es un analito completamente extracelular, que no contacta con nada fuera de la célula. Por ejemplo, el analito extracelular está en el plasma, que no contiene células. La célula se puede eliminar por completo y el analito extracelular aún se puede recoger.
 40

Por el contrario, partículas virales, estando fuera de la célula, están unidos a la pared celular. Es bien conocido en la técnica mezclar un cóctel de anticuerpos para detectar una fracción unida intracelular y una fracción unida a la superficie. Pero, los métodos descritos en el presente documento son diferentes y detectan una porción intracelular lisada y una proteína sérica disociada.
 45

En una realización preferida, el analito extracelular es proteína C reactiva y el analito intracelular es proteína MxA. Esta es una prueba serológica para la detección de antígenos de PCR y MxA. MxA es una proteína intracelular dentro de los glóbulos blancos. PCR es una proteína extracelular que se encuentra en la sangre completa, el plasma y el suero.
 50

En un método preferido, las fibras de vidrio, tales como los filtros Whatman GD, atrapan físicamente los eritrocitos. Se pueden añadir lectinas y/o anticuerpos de unión a eritrocitos específicos para unirse físicamente a los eritrocitos en la matriz de fibra de vidrio. Las soluciones de lisis de leucocitos, que lisan los leucocitos para liberar la MxA intracelular, pueden incorporarse a los filtros de fibra de vidrio.
 55

En algunas realizaciones preferentes, la muestra de sangre entera se añade al filtro de fibra de vidrio. La sangre líquida disuelve los agentes de lisis incluidos, que lisa los leucocitos. La inmunocromatografía de flujo lateral se inicia agregando el tampón de carrera. El tampón de carrera lleva los conjugados de anticuerpos adecuados que se unen a la PCR extracelular y a la MxA intracelular recientemente liberada. Todo el complejo se mueve hacia la zona de detección donde los anticuerpos específicos inmovilizados capturan los complejos respectivos para formar el sándwich. Se forman diferentes líneas de prueba con MxA y PCR. Estas líneas de prueba pueden ser visuales, fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, paramagnéticas o cualquier combinación de estos. Se pueden incorporar diferentes colorantes para distinguir las líneas de prueba de MxA y PCR. Cualquiera de los ensayos y
 60
 65

configuraciones de flujo lateral descritos en el presente documento podría usarse para detectar simultáneamente MxA y PCR u otros analitos intracelulares y extracelulares.

Aglutinación de MxA y PCR

5 Algunas realizaciones incluyen una prueba de aglutinación simple para MxA y PCR en sangre. Como analogía, los presentes inventores creen que el cemento en una pared de ladrillos está separando los ladrillos en lugar de mantenerlos juntos. La razón es que si se elimina el cemento, los ladrillos se unen y caen juntos en un montón. Por lo tanto, si el cemento se "inactiva" o se elimina, los ladrillos individuales se unen.

10 Los conjugados de oro y las perlas de látex son partículas coloidales que se repelen entre sí y, por lo tanto, se unen en suspensión. Si se elimina la fuerza repulsiva, o las partículas coloidales individuales se reticulan juntas, se unen y se pueden visualizar las partículas aglutinadas. La reticulación para superar esta repulsión natural se logra mediante la presencia del analito de antígeno en cuestión.

15 En una realización preferida, MxA monoclonal KM 1124 y/o KM 1135 se conjuga con partículas de oro coloidal rojo. Los anticuerpos monoclonales anti-PCR se conjugan con perlas de látex verdes de tamaño adecuado. En presencia de MxA, el anticuerpo monoclonal KM 1124 y/o KM 1135 se une y, como hay una multiplicidad de epítomos reconocidos por KM 1124 y/o KM 1135, se produce una reticulación natural del oro coloidal y se ve el agrupamiento de las partículas de oro coloidal rojas. Este proceso depende del antígeno y es bastante rápido, produciéndose generalmente en un minuto o dos. El mismo fenómeno tiene lugar con las perlas de látex coloidal verdes recubiertas con anticuerpos monoclonales adecuados en presencia de un analito de PCR.

20 El agrupamiento de partículas de oro rojas significa que hay al menos una cantidad umbral de MxA en la muestra, lo que indica una infección vírica. El agrupamiento de perlas verdes significa que hay al menos una cantidad umbral de PCR en la muestra, lo que indica una infección bacteriana. El agrupamiento de las partículas rojas y verdes significa una coinfección o es indicativo de un resultado indeterminado. La ausencia de cualquier agrupamiento indica que la muestra es negativa para infección vírica y bacteriana.

25 En una realización preferida, la concentración umbral de proteína C reactiva es igual o mayor que aproximadamente 6-15 mg/l de proteína C reactiva y la concentración umbral de proteína MxA es igual o mayor que un equivalente en suero de aproximadamente 15-250 ng/ml. Como MxA es un biomarcador intracelular, la muestra de sangre se lisa, preferentemente, durante el ensayo para lisar los glóbulos blancos y externalizar el antígeno MxA. En otras realizaciones, la muestra se lisó antes de realizar el ensayo. Cualquier formato de inmunoensayo conocido en la técnica podría usarse para el ensayo de aglutinación. Se añaden los reactivos y luego el usuario espera para ver si los reactivos se aglutinan en presencia de la muestra.

Nanopartículas en el diagnóstico de virus

30 Los niveles de MxA están elevados en bastantes infecciones víricas, pero no en todas. Algunas excepciones a los niveles elevados de MxA durante la infección son la hepatitis B y tales infecciones víricas crónicas, incluyendo, quizás, VIH y hepatitis C. El ácido siálico se encuentra en un mayor número de virus. Pero, el ácido siálico no se encuentra en algunos virus, tal como el virus Cox.

35 La combinación de dispositivos detectores de MxA-PCR descritos anteriormente se usa, preferentemente, en personas con fiebre para distinguir entre infecciones víricas y bacterianas. La prueba de nanopartículas de ácido siálico se usa, preferentemente, en todas las demás infecciones víricas sospechosas (con o sin fiebre acompañante), incluyendo infecciones víricas crónicas. Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas, el ácido siálico reemplaza a MxA en los métodos y dispositivos descritos en el presente documento.

40 En otra realización preferida, una prueba incluye MxA, PCR, y una nanopartícula homóloga de ácido siálico.

45 En una realización preferida, la línea de prueba es una nanopartícula específica para un virus en particular. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, gripe aviar y virus que causan infección crónica, tal como el VIH o la hepatitis C. El conjugado es a) una nanomicela específica de virus con un colorante en su interior o b) una nanomicela homóloga de ácido siálico con un colorante en su interior.

50 Por ejemplo, Nanoviricides, Inc. (West Haven, Connecticut) tiene una nanopartícula específica para la gripe aviar. Esa nanopartícula se puede usar en la línea de prueba y una nanomicela homóloga de ácido siálico como el conjugado para detectar la gripe aviar.

55 Otra realización incluye un detector viral de amplio espectro. En esta realización, la línea de prueba es una nanopartícula homóloga de ácido siálico que captura todos los virus y el conjugado es una nanomicela de ácido siálico con colorante en el interior.

60 En realizaciones preferidas, la línea de prueba está hecha de nanopartículas, no nanomicelas que contienen las

nanopartículas. El conjugado, por otro lado, es, preferentemente, una nanomicela (análoga a una burbuja de jabón) que absorbe los colorantes dentro de la micela. La porción lipídica de la micela es la responsable de las propiedades "adelgazantes" de la micela.

- 5 Las realizaciones de ácido siálico pueden usar cualquiera de las configuraciones de tiras reactivas descritas en el presente documento, o conocidas en la técnica, incluyendo las mostradas en las Figuras 4-8 y 10-12, u otras configuraciones de ensayo conocidas en la técnica.

- 10 Por consiguiente, debe entenderse que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento son meramente ilustrativas de la aplicación de los principios de la invención. La referencia en el presente documento a detalles de las realizaciones ilustradas no pretende limitar el alcance de las reivindicaciones, que ellas mismas recitan las características consideradas esenciales para la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si una infección es bacteriana y/o vírica, que comprende las etapas de:

- 5 a) recoger una muestra;
- b) transferir la muestra a un dispositivo de análisis de muestras que comprende:
 - i) un compresor de muestras que comprende:
 - 10 A) una primera zona de reactivos que comprende al menos un primer reactivo específico para la proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si hay un nivel bajo de proteína C reactiva presente en la muestra, y al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si hay MxA presente en la muestra; y
 - 15 B) una segunda zona de reactivos que comprende al menos un tercer reactivo específico para la proteína C reactiva, en donde el tercer reactivo solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es más alto que el nivel de proteína C reactiva detectado por el primer reactivo, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel más alto de proteína C reactiva está presente en la muestra;
 - 20 ii) una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral que comprende:
 - 25 A) una primera zona de detección que comprende un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado; y un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado; y
 - B) una primera zona de desviación situada aguas arriba de la primera zona de detección en la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, en donde la primera zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral; y
 - 30 iii) una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, que comprende:
 - 35 A) una segunda zona de detección que comprende un tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado; y
 - B) una segunda zona de desviación situada aguas arriba de la segunda zona de detección en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, en la que la zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral;
 - 40 iv) una primera zona de aplicación de muestras donde la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestras, en donde la primera zona de aplicación de muestras se encuentra en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la primera zona de reactivos del compresor de muestras; y
 - 45 v) una segunda zona de aplicación de muestras donde la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestras, en donde la segunda zona de aplicación de muestras está situada en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la segunda zona de reactivos del compresor de muestras;

en donde el compresor de muestras está en un plano diferente que la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral y la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral;

en donde la primera zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la primera zona de desviación y la segunda zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la segunda zona de desviación, desviando el flujo hacia el compresor de muestras y devolviendo el flujo a la primera tira de prueba cromatográfica y la segunda tira de prueba cromatográfica al final de la primera zona de desviación y la segunda zona de desviación;

- 55 c) analizar la muestra para detectar la presencia del nivel bajo de proteína C reactiva, MxA y el nivel alto de proteína C reactiva.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de análisis de muestras comprende además un primer compañero de unión de control situado en cada una de la primera zona de reactivos y la segunda zona de reactivos del compresor de muestras y un segundo compañero de unión de control inmovilizado en una zona de control de cada una de la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral y la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, en donde el primer compañero de unión de control es un compañero de unión para el segundo compañero de unión de control.

3. Un método para determinar si una infección es bacteriana y/o vírica, que comprende las etapas de:

- 65 a) recoger una muestra;

b) transferir la muestra a un dispositivo de análisis de muestras que comprende:

i) una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral que comprende:

5 una primera zona de reactivos que comprende al menos un primer reactivo específico para la proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si un nivel bajo de proteína C reactiva está presente en la muestra;
 10 una segunda zona de reactivos que comprende al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si hay MxA presente en la muestra; y
 una zona de detección que comprende un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado; y un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado; y

15 ii) una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, que comprende:
 al menos una tercera zona de reactivos que comprende:

20 al menos un tercer reactivo específico para la proteína C reactiva, en donde el tercer reactivo solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es más alto que el nivel de proteína C reactiva detectado por el primer reactivo, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel más alto de proteína C reactiva está presente en la muestra; y
 una zona de detección que comprende un tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado; y

25 c) analizar la muestra para detectar la presencia del nivel bajo de proteína C reactiva, MxA y el nivel alto de proteína C reactiva.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una concentración umbral para obtener un resultado positivo para el nivel bajo de proteína C reactiva en la zona de detección de la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral es igual o mayor que un equivalente en suero de 6-15 mg/l de proteína C reactiva y, preferentemente, igual o mayor que un equivalente en suero de aproximadamente 10 mg/l de proteína C reactiva.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una concentración umbral para obtener un resultado positivo para el nivel más alto de proteína C reactiva en la zona de detección de la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral es igual o mayor que un equivalente en suero de 60-100 mg/l y, preferentemente, igual o mayor que un equivalente en suero de aproximadamente 80 mg/l.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una concentración umbral para obtener un resultado positivo para MxA en la zona de detección de la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral es igual o mayor de 15-250 ng/ml y, preferentemente, igual o mayor de aproximadamente 40 ng/ml.

7. El método de las reivindicaciones 1 o 3, en el que la etapa c) comprende las subetapas de:

45 i) eluir la muestra en el dispositivo de análisis de muestras; y
 ii) determinar visualmente un resultado de la zona de detección.

8. El método de las reivindicaciones 1 o 3, en el que la presencia de MxA se indica mediante una primera línea de prueba situada en la zona de detección de la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral y la presencia del nivel bajo de proteína C reactiva se indica mediante una segunda línea de prueba situada en la zona de detección de la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral.

9. El método de la reivindicación 8, en el que 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 positiva; y, opcionalmente, en el que tanto la primera línea de prueba como la segunda línea de prueba están situadas en el mismo hueco en el dispositivo de análisis de muestras de modo que se forma un tercer color cuando tanto la primera línea de prueba como la segunda línea de prueba son positivas.

10. El método de la reivindicación 8, en el que la primera línea de prueba está espacialmente separada de la segunda línea de prueba en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral.

11. El método de las reivindicaciones 1 o 3, en el que la muestra es una muestra de sangre o la muestra contiene leucocitos.

12. Un dispositivo de flujo lateral para detectar un analito en una muestra, que comprende:

65 a) un compresor de muestras que comprende:

- 5 i) una primera zona de reactivos que comprende al menos un primer reactivo específico para la proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si hay un nivel bajo de proteína C reactiva presente en la muestra, y al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si hay MxA presente en la muestra; y
- 10 ii) una segunda zona de reactivos que comprende al menos un tercer reactivo específico para la proteína C reactiva que solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es mayor que el nivel de proteína C reactiva detectado por el segundo reactivo, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel más alto de proteína C reactiva está presente en la muestra;
- b) una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral que comprende:
- 15 i) una primera zona de detección que comprende un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado; y un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado; y
- ii) una primera zona de desviación situada aguas arriba de la primera zona de detección en la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, en donde la primera zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral; y
- 20 c) una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, que comprende:
- i) una segunda zona de detección que comprende un tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado; y
- 25 ii) una segunda zona de desviación situada aguas arriba de la primera zona de detección en la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, en donde la segunda zona de desviación interrumpe el flujo lateral en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral; y
- 30 d) una primera zona de aplicación de muestras en la que la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestras, en donde la primera zona de aplicación de muestras se encuentra en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la primera zona de reactivos del compresor de muestras;
- e) una segunda zona de aplicación de muestras en la que la muestra se coloca en el dispositivo de análisis de muestras, en donde la segunda zona de aplicación de muestras está situada en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en: i) en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral aguas arriba de la zona de detección y ii) en la segunda zona de reactivos del compresor de muestras;
- 35 en donde el compresor de muestras está en un plano diferente que la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral y la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral;
- 40 en donde la primera zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la primera zona de desviación y la segunda zona de reactivos del compresor de muestras crea un puente sobre la segunda zona de desviación, desviando el flujo hacia el compresor de muestras y devolviendo el flujo a la primera tira reactiva cromatográfica y la segunda tira reactiva cromatográfica al final de la primera zona de desviación y la segunda zona de desviación.
- 45 13. El dispositivo de la reivindicación 12, en donde el dispositivo comprende además un primer compañero de unión de control situado en cada una de las primeras zonas de reactivos y las segundas zonas de reactivos del compresor de muestras y un segundo compañero de unión de control inmovilizado en una zona de control de cada uno del primer flujo lateral. tira reactiva cromatográfica y la segunda tira reactiva de flujo lateral cromatográfica, en donde el primer compañero de unión de control es un compañero de unión para el segundo compañero de unión de control.
- 50 14. Un dispositivo para la detección de un marcador bacteriano y/o vírico en una muestra, que comprende:
- a) una primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral que comprende:
- 55 una primera zona de reactivos que comprende al menos un primer reactivo específico para la proteína C reactiva de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el primer reactivo, se forma un primer complejo marcado si un nivel bajo de proteína C reactiva está presente en la muestra;
- una segunda zona de reactivos que comprende al menos un segundo reactivo específico para MxA de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el segundo reactivo, se forma un segundo complejo marcado si hay MxA presente en la muestra; y
- 60 una primera zona de detección que comprende un primer compañero de unión que se une al primer complejo marcado; y un segundo compañero de unión que se une al segundo complejo marcado; y
- b) una segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral paralela en una dirección de flujo lateral a la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, que comprende:
- 65

- 5 al menos una tercera zona de reactivos que comprende al menos un tercer reactivo específico para la proteína C reactiva, en donde el tercer reactivo solo detecta un nivel de proteína C reactiva que es más alto que el nivel de proteína C reactiva detectado por el primer reactivo, de manera que, cuando la muestra entra en contacto con el tercer reactivo, se forma un tercer complejo marcado si el nivel más alto de proteína C reactiva está presente en la muestra; y
una segunda zona de detección que comprende un tercer compañero de unión que se une al tercer complejo marcado.
- 10 15. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la primera zona de detección de la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende una primera línea de prueba para detectar un resultado positivo para MxA en la muestra y una segunda línea de prueba para detectar un resultado positivo para el nivel bajo de proteína C reactiva en la muestra.
- 15 16. El dispositivo de la reivindicación 15, en el que 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 positiva; y, opcionalmente, en donde tanto la primera línea de prueba como la segunda línea de prueba están situadas en el mismo hueco en la primera tira reactiva de cromatografía de flujo lateral de modo que se forma un tercer color cuando tanto la primera línea de prueba como la segunda línea de prueba son positivas.
- 20 17. El dispositivo de la reivindicación 15, en el que la primera línea de prueba está espacialmente separada de la segunda línea de prueba en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral.
- 25 18. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la primera zona de detección y la segunda zona de detección comprenden cada una una línea de control que es visible a simple vista cuando el dispositivo está funcionando.
- 30 19. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende además una primera zona de aplicación de muestras aguas arriba de la primera zona de reactivos, la segunda zona de reactivos y la primera zona de detección, y la primera zona de detección está aguas abajo de la primera zona de reactivos y la segunda zona de reactivos.
- 35 20. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende además una segunda zona de aplicación de muestras aguas arriba de la tercera zona de reactivos, y la segunda zona de detección, y la segunda zona de detección está aguas abajo de la tercera zona de reactivos.
- 40 21. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende además una zona de lisis que comprende al menos un agente de lisis, en donde el agente de lisis entra en contacto con la muestra en la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral.
- 45 22. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende además una zona de lisis que comprende al menos un agente de lisis, en donde el agente de lisis entra en contacto con la muestra en la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral.
- 50 23. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la primera tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende además una primera zona de aplicación de muestra aguas abajo de la primera zona de reactivos y la segunda zona de reactivos, y aguas arriba de la primera zona de detección.
24. El dispositivo de las reivindicaciones 12 o 14, en el que la segunda tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende además una segunda zona de aplicación de muestra aguas abajo de la tercera zona de reactivos y aguas arriba de la segunda zona de detección.

Fig. 1

Estado de la enfermedad	Resultado visual de la prueba	Proteína C reactiva (>15 mg/l)	MxA (> 235 ng/ml)
Infección vírica	A	Negativo	Positivo
Infección bacteriana	B	Positivo	Negativo
Coinfección	C	Positivo	Positivo
No infeccioso	D	Negativo	Negativo

	Línea de control	Ensayo de PCR	Ensayo de MxA	
A	█	█	█	Infección vírica
B	█	█		Infección bacteriana
C	█	█	█	Coinfección
D	█			No infeccioso

Fig. 2

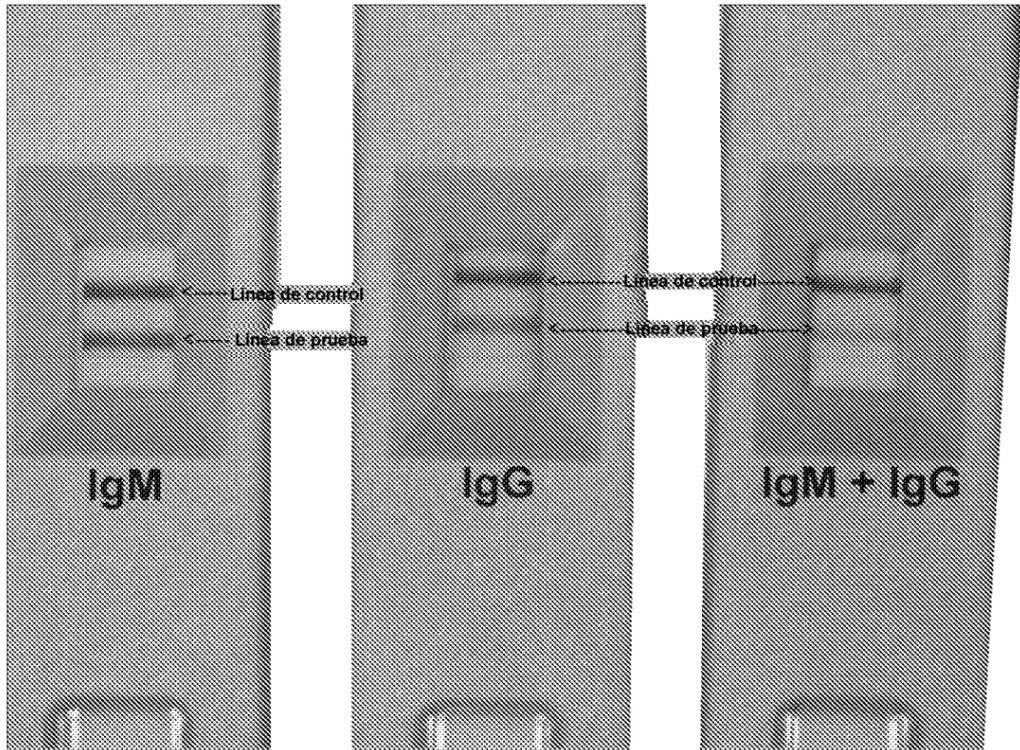


Figura 3

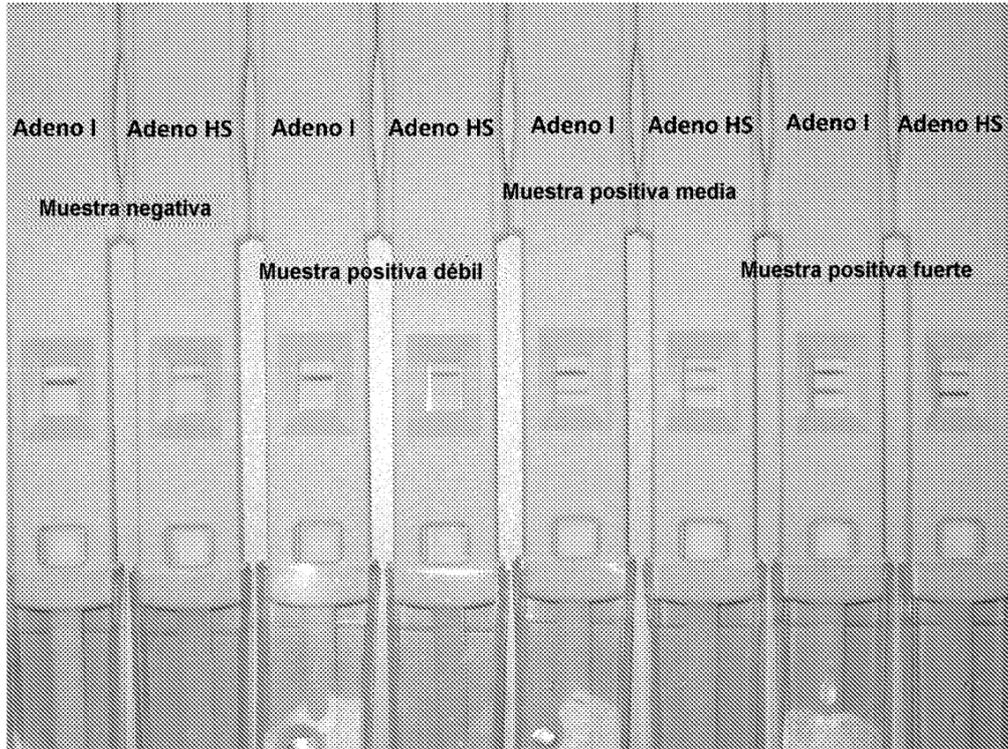


Fig. 4A

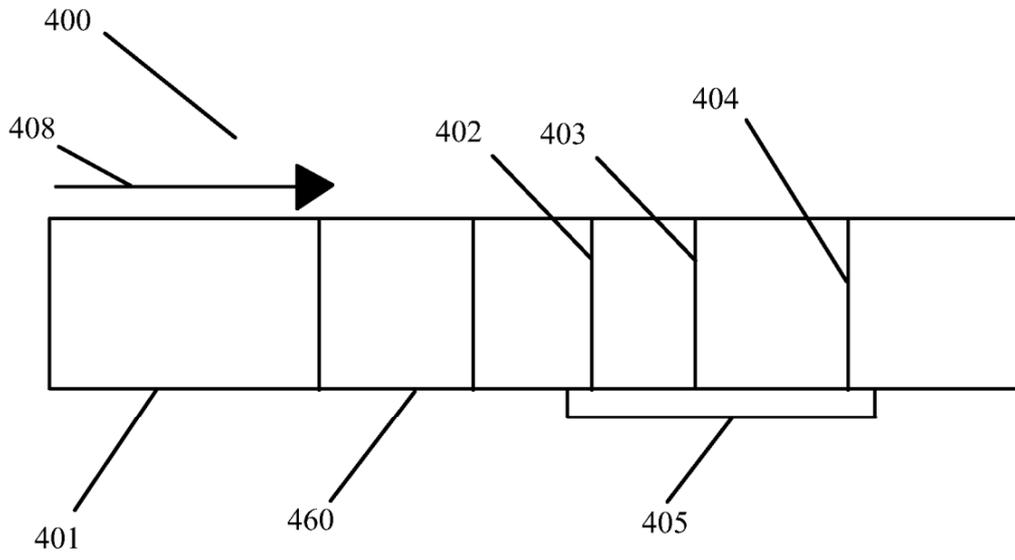


Fig. 4B

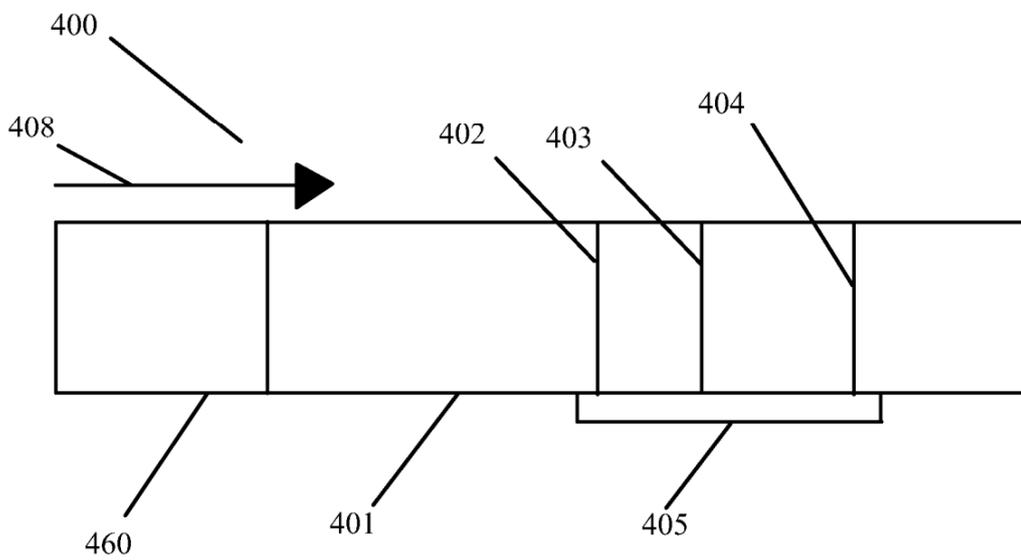


Fig. 5A

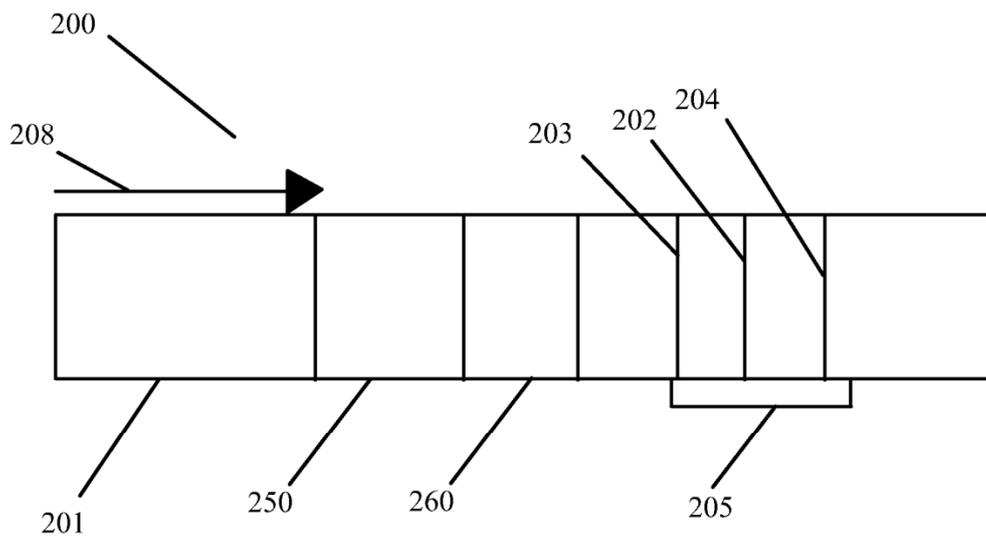


Fig. 5B

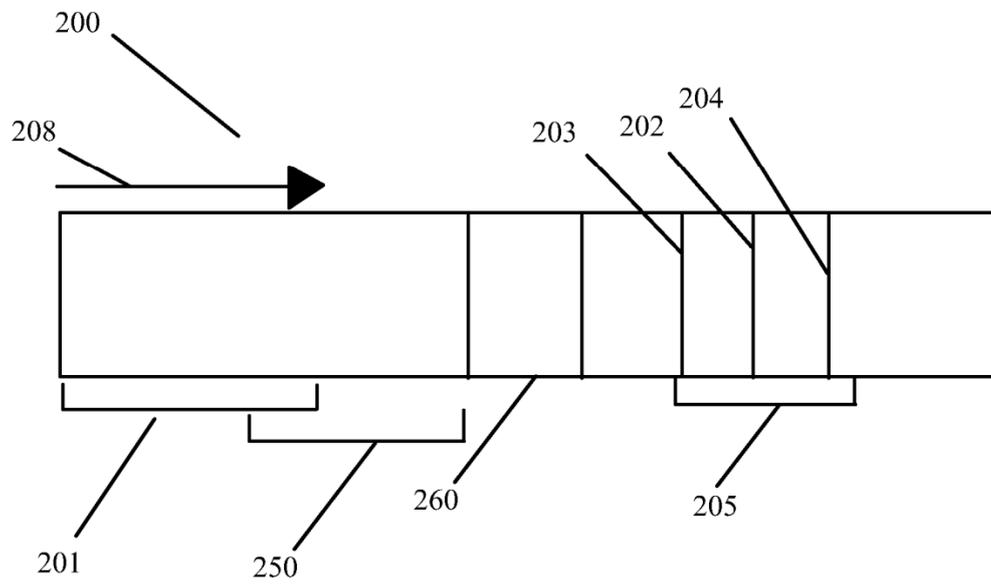


Fig. 5C

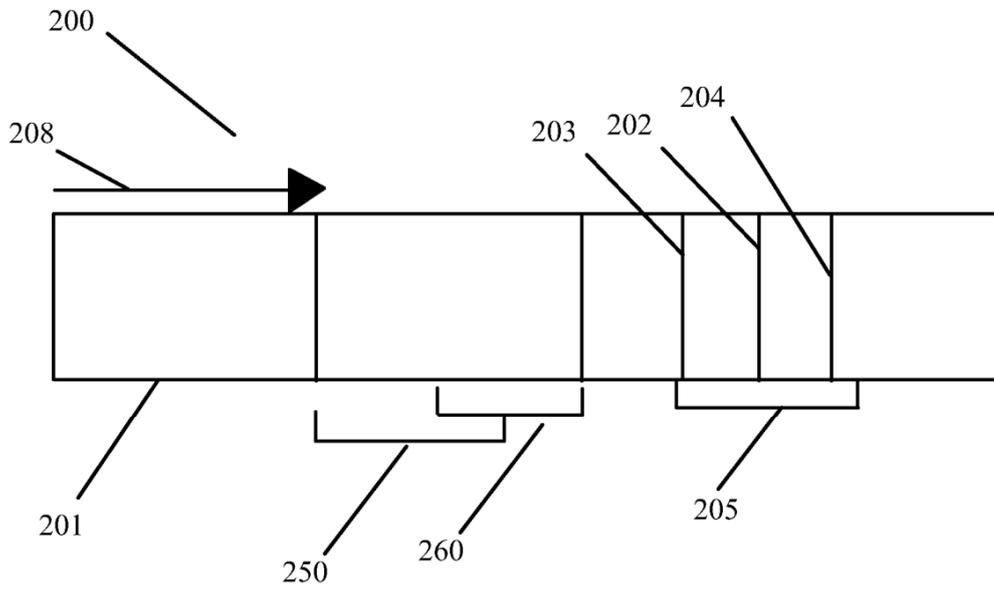


Fig. 5D

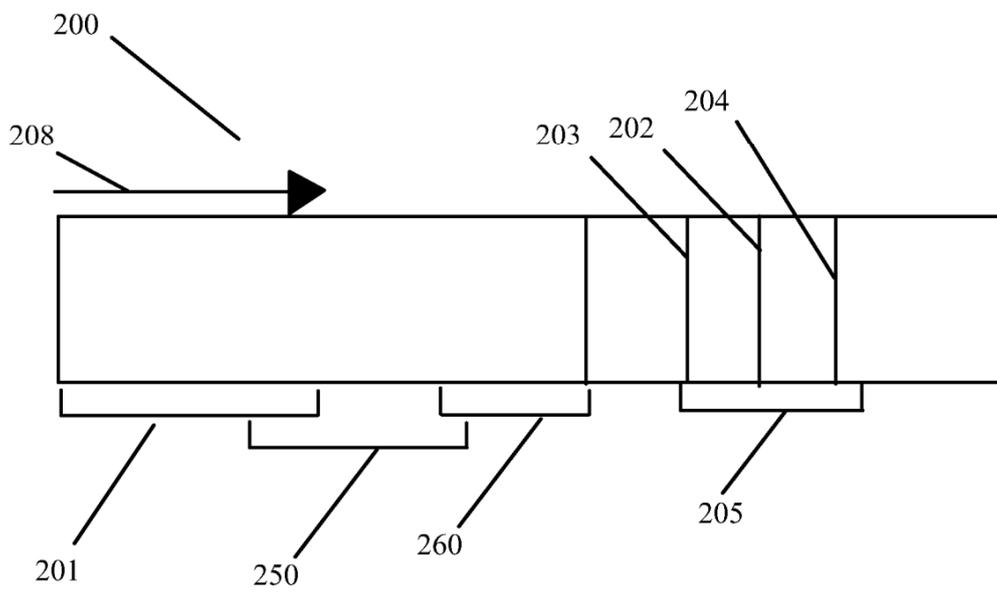


Fig. 6A

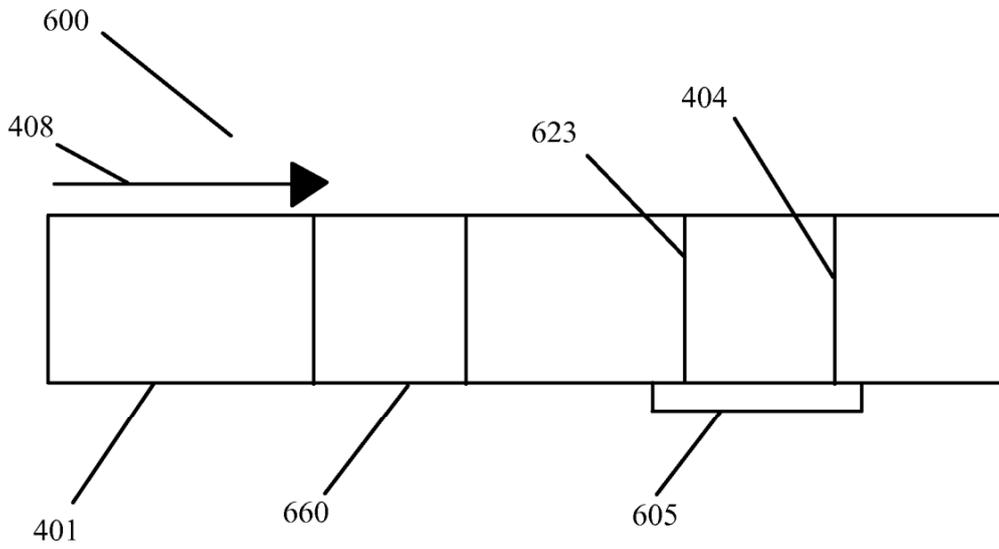


Fig. 6B

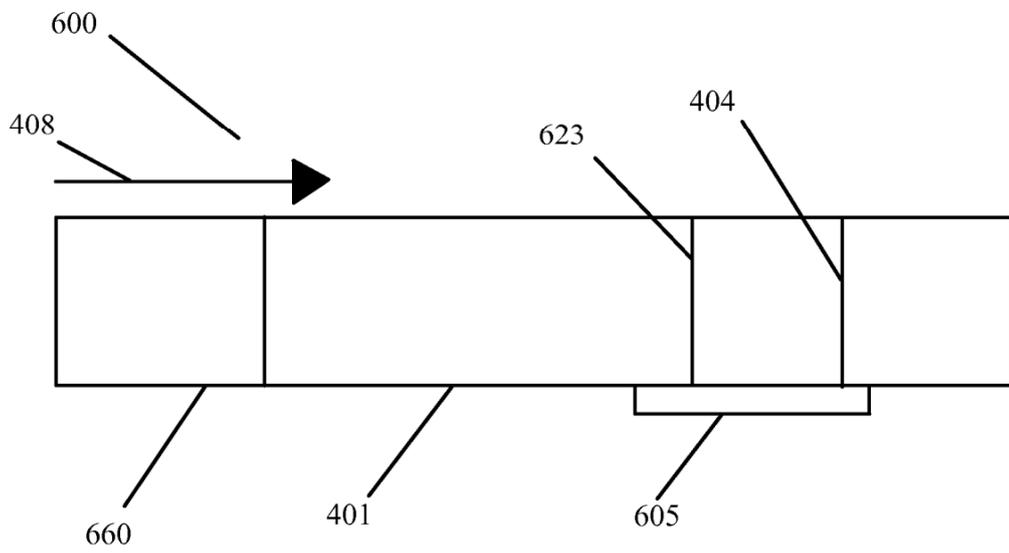


Fig. 7A

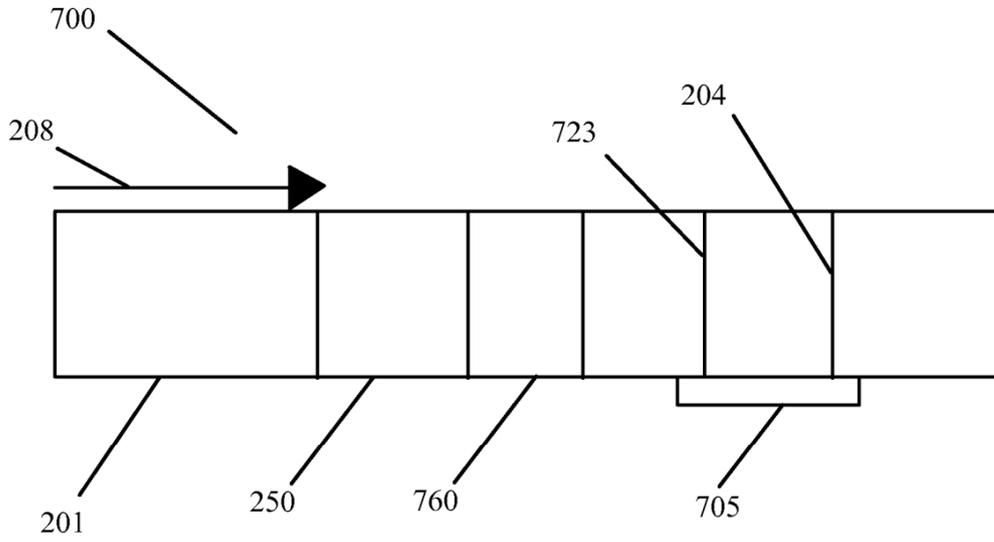


Fig. 7B

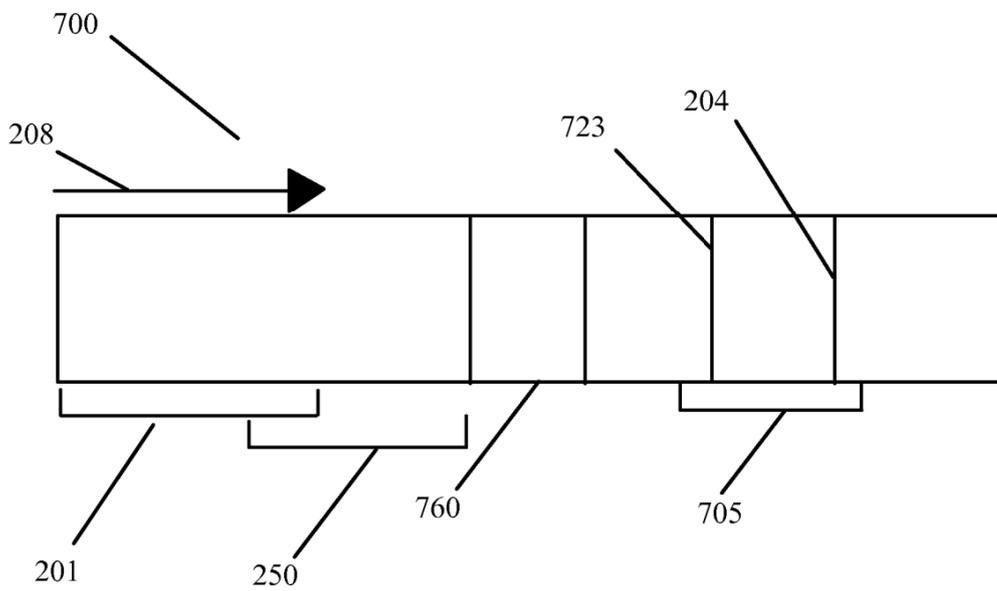


Fig. 7C

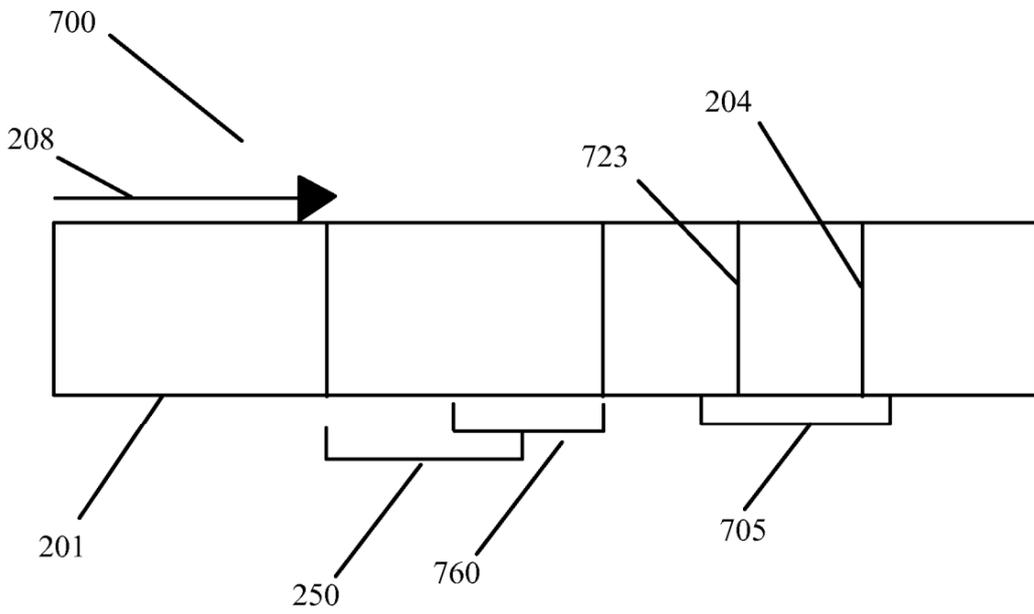


Fig. 7D

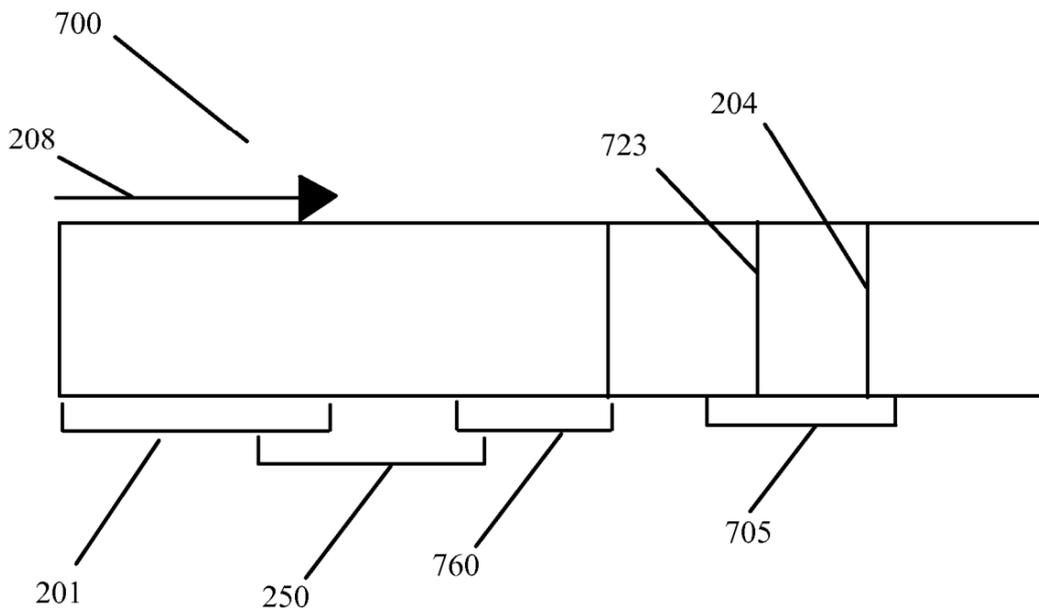


Fig. 8B

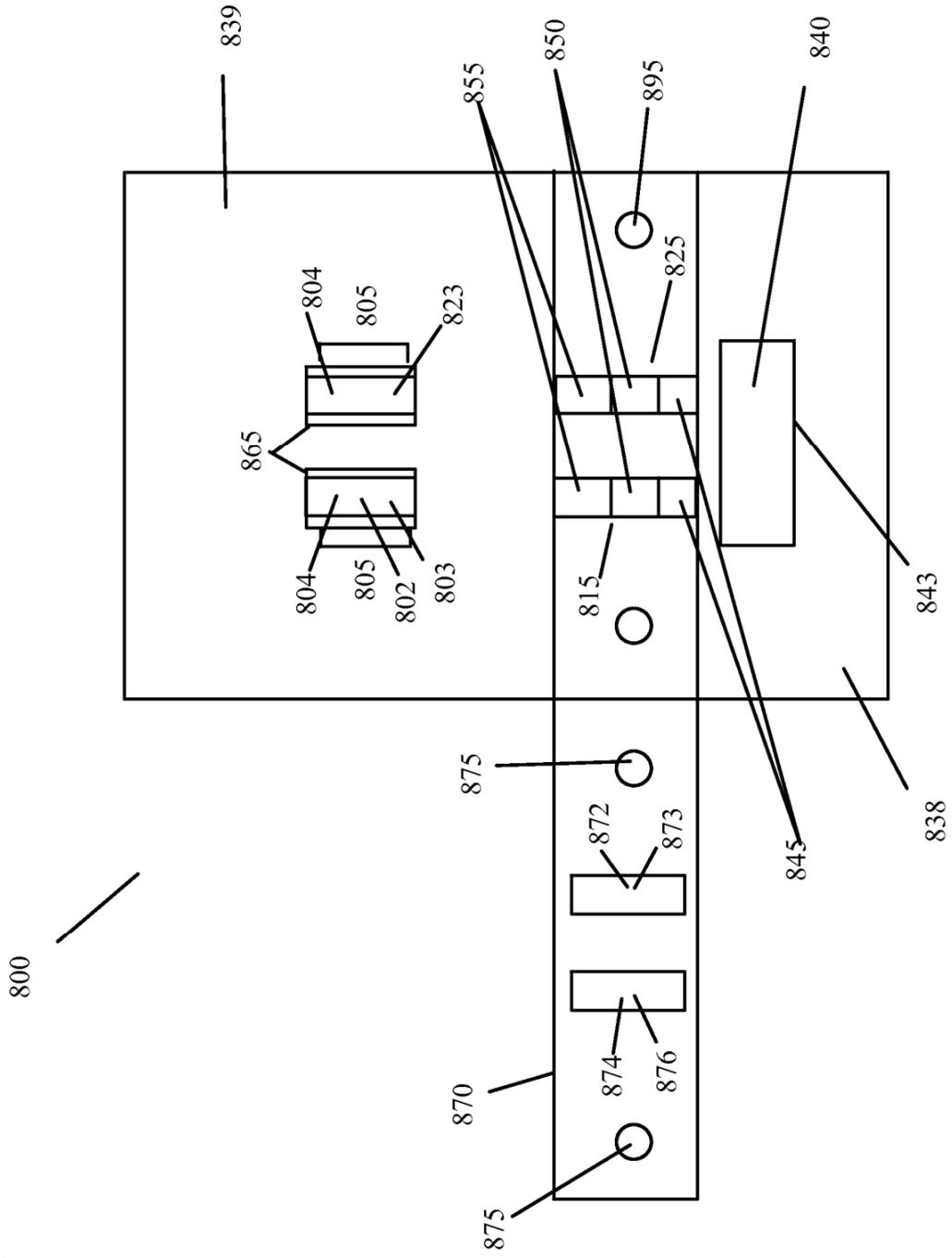


Fig. 8C

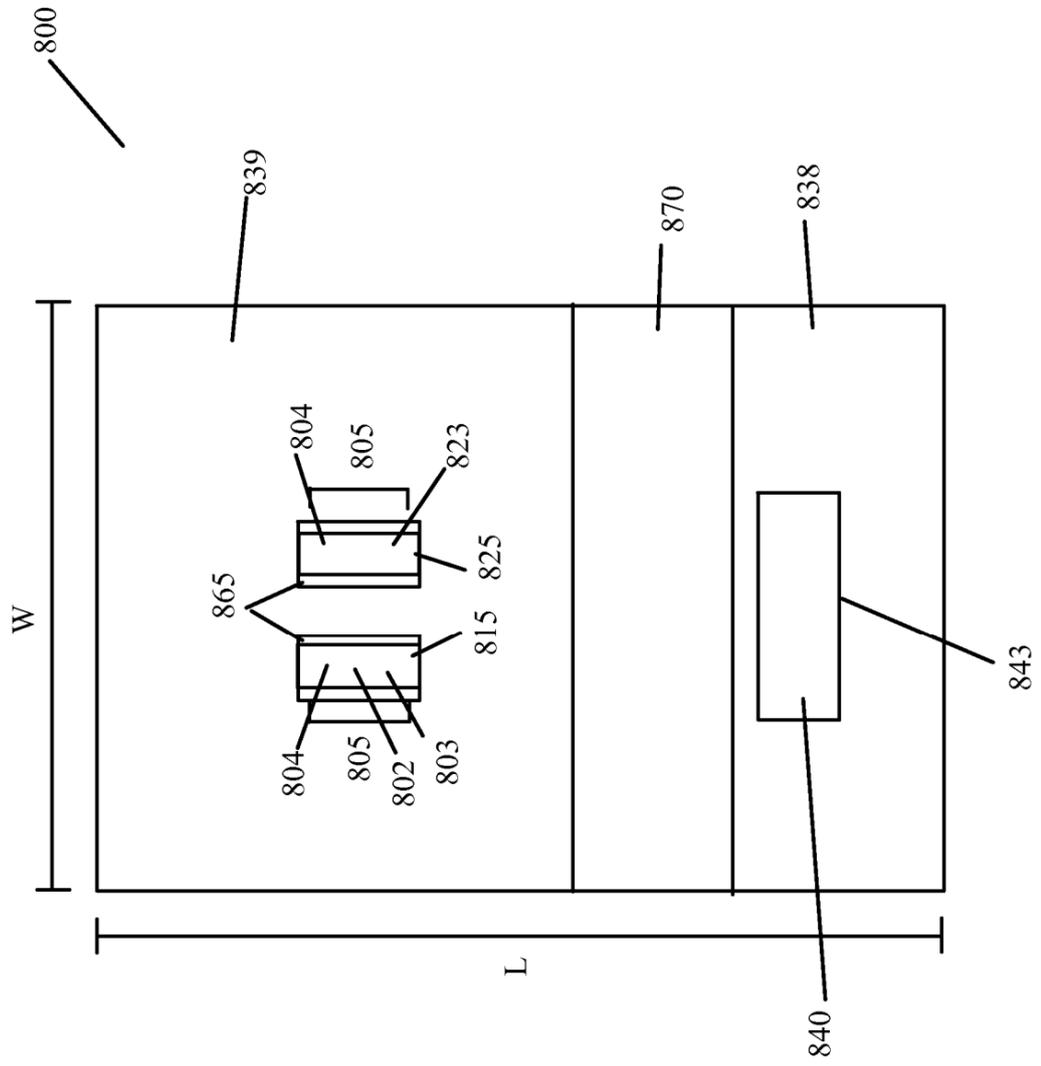


Fig. 9A

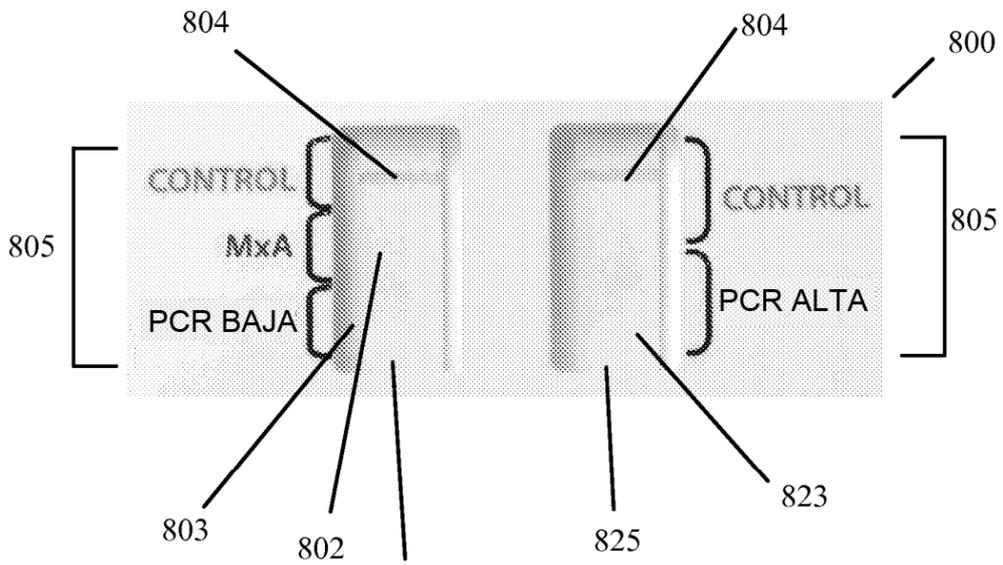


Fig. 9B

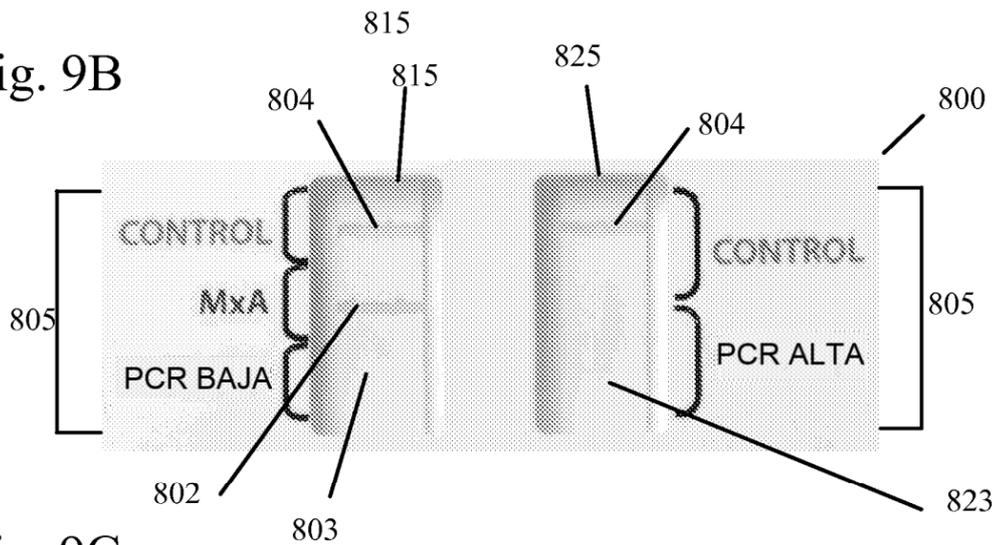


Fig. 9C

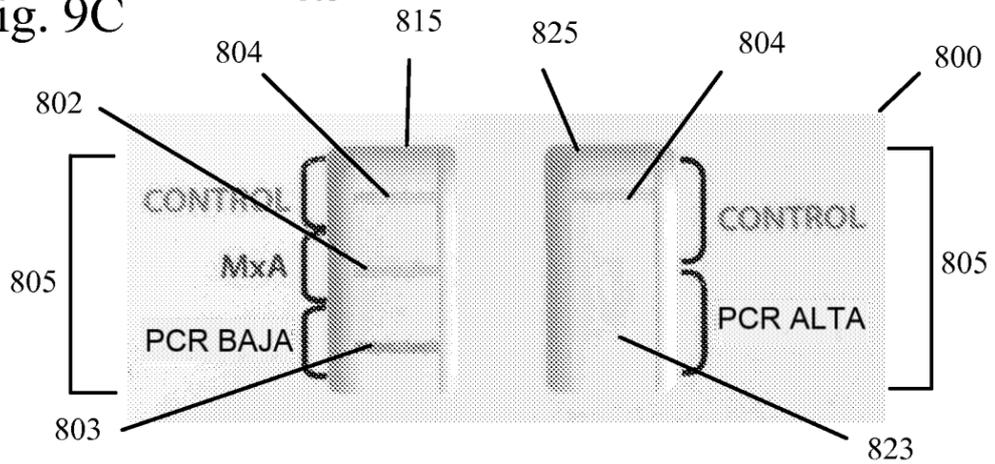


Fig. 9D

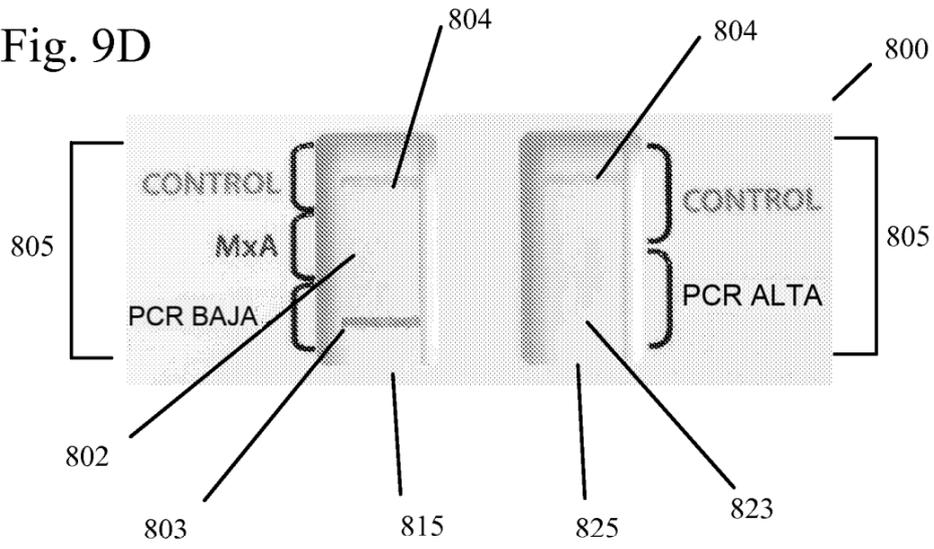


Fig. 9E

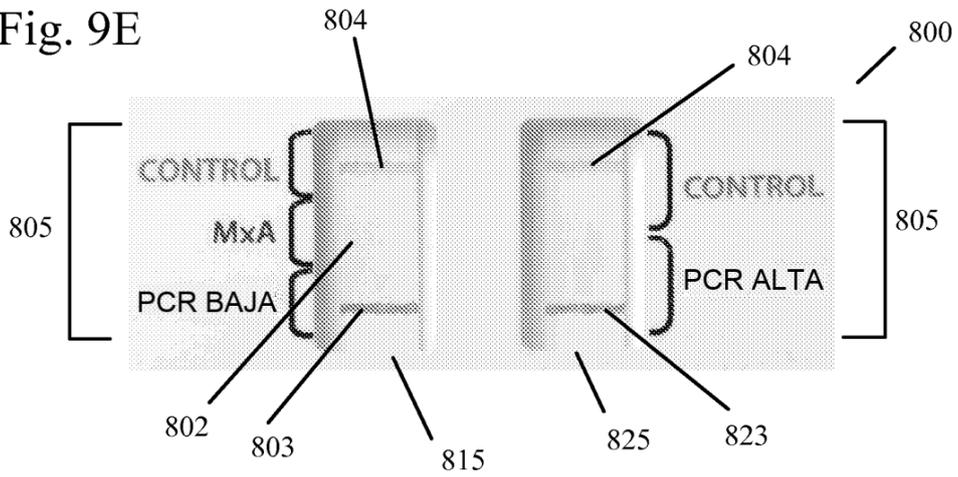


Fig. 9F

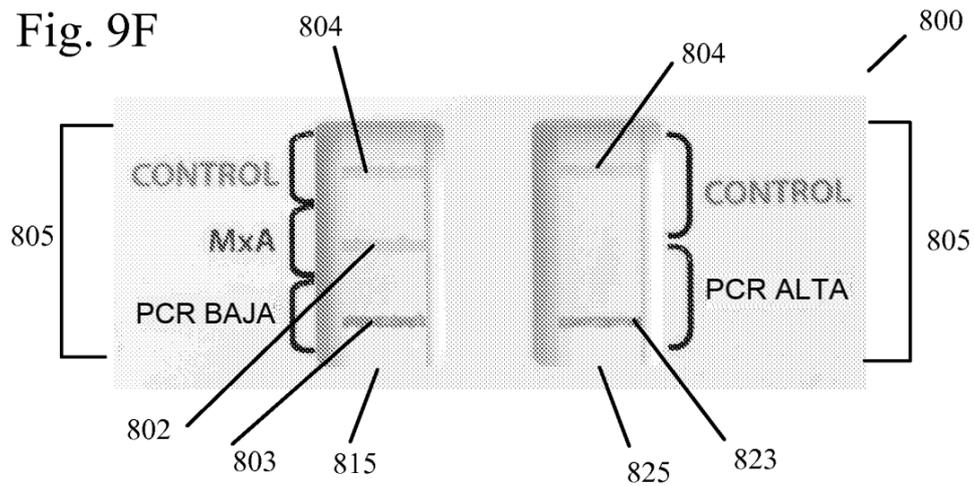
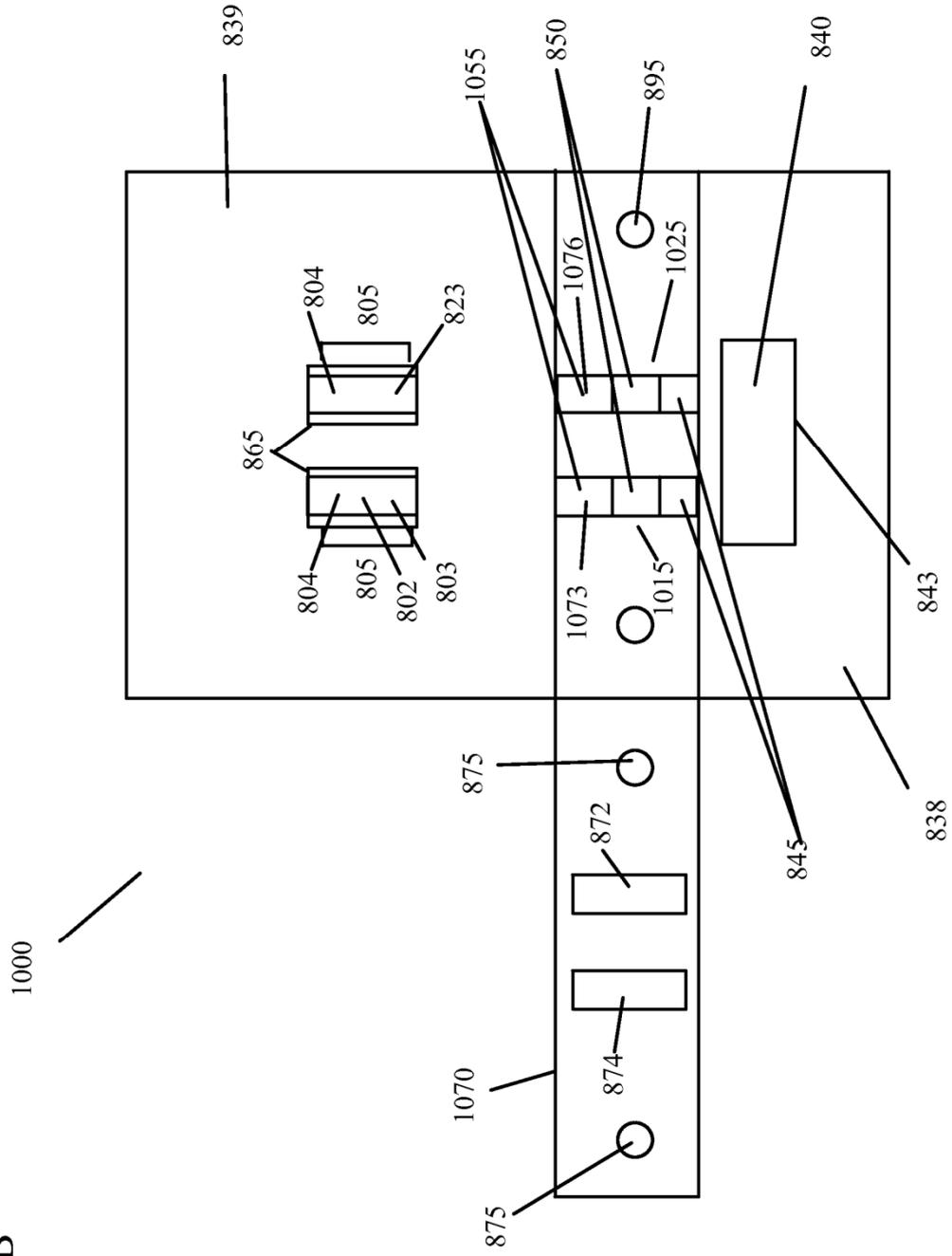
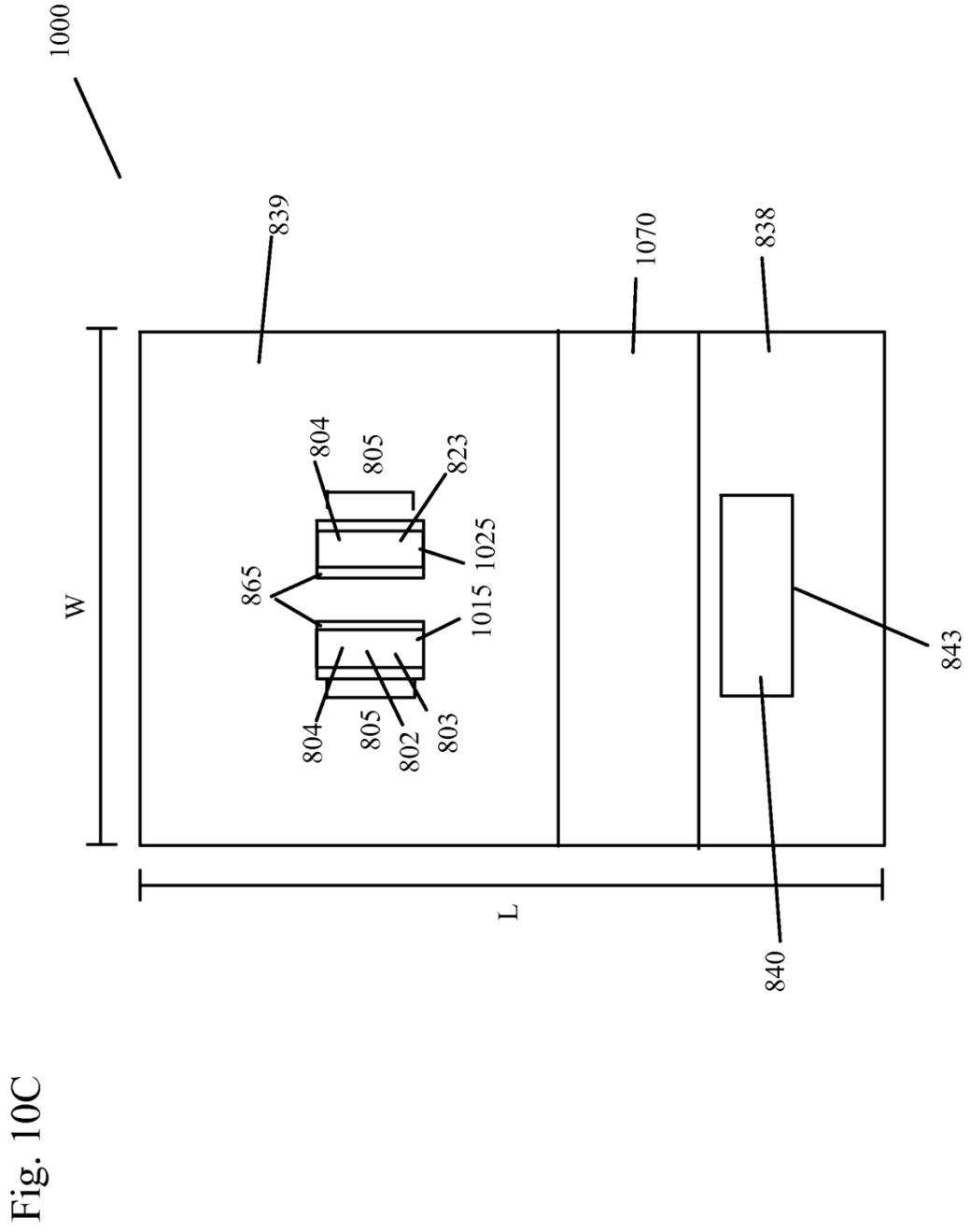


Fig. 10B





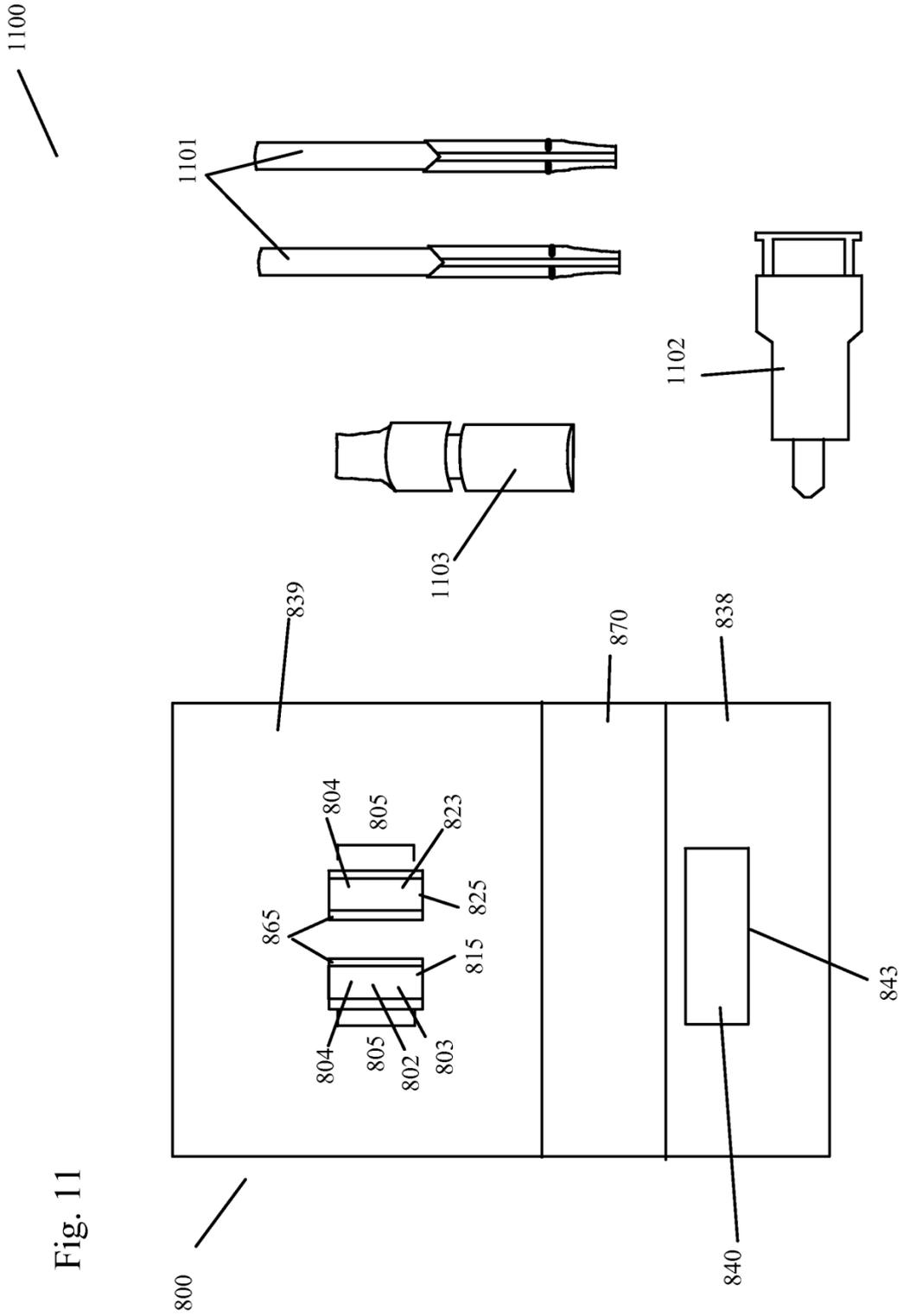


Fig. 11

Fig. 12

