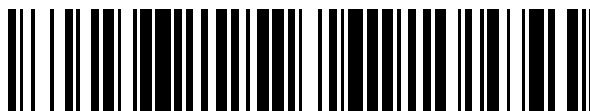


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 688**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**C40B 60/12** (2006.01)  
**G01N 21/75** (2006.01)  
**G01N 33/538** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2015 PCT/US2015/017480**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153018**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2015 E 15774432 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3126486**

54 Título: **Inmunoensayo que utiliza captura de conjugado**

30 Prioridad:

**02.04.2014 US 201461974060 P**

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

**17.03.2020**

73 Titular/es:

**CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC. (100.0%)  
3661 Horse Block Road  
Medford, NY 11763, US**

72 Inventor/es:

**ESFANDIARI, JAVANBAKSH**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 748 688 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo que utiliza captura de conjugado

Antecedentes de la invención

1. Patentes relacionadas

5 Esta solicitud se refiere a las patentes estadounidenses de cotitularidad N.º 7.189.522, 7.682.801, 7.879.597, 8.507.259 y 8.603.835.

2. Campo

10 En términos generales, la descripción objeto se refiere a métodos y dispositivos de inmunoensayo. Más particularmente, la descripción objeto se refiere a la detección de uno o más ligandos particulares en un líquido corporal que contiene posiblemente ligandos emparentados adicionales.

3. Estado de la técnica

15 Se han utilizado muchos tipos de ensayos ligando-receptor para detectar la presencia de varias sustancias, con frecuencia, los denominados generalmente ligandos, en líquidos corporales tales como sangre, orina o saliva. Estos ensayos implican reacciones de antígenos y anticuerpos, conjugados sintéticos que comprenden marcadores de disoluciones de metales y de poliestireno radioactivos, enzimáticos, fluorescentes u observables visualmente y, especialmente, cámaras de reactor diseñadas. En todos estos ensayos, existe un receptor, por ejemplo, un anticuerpo, que es específico para el ligando o antígeno seleccionado, y un medio para detectar la presencia, y en algunos casos la cantidad, del producto de reacción ligando-receptor. Algunas pruebas se diseñan para hacer una determinación cuantitativa, pero, en muchas circunstancias, todo lo que se requiere es una indicación cualitativa positiva/negativa. Los ejemplos de ensayos cualitativos de este tipo incluyen determinación del grupo sanguíneo, la mayoría de los tipos de análisis de orina, pruebas de embarazo y pruebas de SIDA. Para estas pruebas, se prefiere un indicador observable visualmente tal como la presencia de aglutinación o un cambio de color.

20 La patentes estadounidenses de cotitularidad N.º 7.189.522, 7.682.801, 7.879.597 y 8.507.259 se dirigen a ensayos de detección rápida mejorados que utilizan un dispositivo de flujo lateral de "trayectoria doble". Mas particularmente, el dispositivo de inmunoensayo se proporciona con una primera tira absorbente que proporciona una primera trayectoria de flujo lateral u horizontal para un conjugado y una segunda tira absorbente que proporciona una segunda trayectoria de flujo lateral u horizontal para una muestra. Un sitio de prueba que tiene un mecanismo de unión a ligando inmovilizado se ubica sobre o en al menos una de las tiras, y las tiras se tocan entre sí en el sitio de prueba. Durante el uso, la muestra y una disolución de tampón se proporcionan primero en la segunda tira absorbente y fluyen con paso del tiempo hacia el sitio de prueba a lo largo de la segunda trayectoria de flujo (es decir, no humedecen inmediatamente el sitio de prueba). Si la muestra contiene el ligando de interés, el ligando se captura en el sitio de prueba por medio del mecanismo de unión a ligando inmovilizado. La disolución de tampón proporcionada en la primera tira absorbente transporta el conjugado al sitio de prueba después de que la muestra haya alcanzado el sitio de prueba. Si el ligando se captura en el sitio de prueba, el conjugado se une al ligando capturado y proporciona una indicación de un resultado "positivo" de la prueba; es decir, el ligando de interés estaba presente en la muestra. Si el ligando no se captura en el sitio de prueba, el conjugado no se une y se obtiene un resultado "negativo" de la prueba; es decir, el ligando de interés no estaba presente en la muestra. Se puede proporcionar una línea de control que capture el conjugado cerca del sitio de prueba para confirmar que la prueba se ha llevado a cabo correctamente. Al proporcionar trayectorias de flujo separadas para la muestra y el conjugado, se obtienen una sensibilidad y selectividad sustancialmente mayores en relación a los dispositivos de flujo lateral estándar y los dispositivos de flujo inverso que utilizan tiras individuales.

35 Los dispositivos de trayectoria doble han demostrado también ser consistentes al proporcionar resultados sensibles precisos cuando el sitio de prueba se proporciona con múltiples mecanismos de unión a ligando inmovilizados diferentes; es decir, capacidades múltiples. Por ejemplo, se han proporcionado líneas de prueba separadas en un único dispositivo DPP para detectar por separado y de manera precisa VIH-1, VIH-2 y sífilis.

45 El documento US 2010/112725 se refiere a medios para evitar que la interferencia de sustancias afecte a la precisión de un inmunoensayo de flujo lateral.

Compendio de la invención

50 La presente invención proporciona un dispositivo (10) de prueba para determinar la presencia de un primer ligando de un primer virus en una muestra líquida, que comprende: a) una primera tira (30) absorbente que tiene una primera ubicación (24) para recibir una disolución y definir una primera trayectoria de migración; b) un conjugado marcador adaptado para moverse a lo largo de dicha primera trayectoria de migración y unirse a dicho primer ligando; c) una segunda tira (32) absorbente distinta de dicha primera tira absorbente y que tiene una segunda ubicación (26) para recibir la muestra líquida y definir una segunda trayectoria de migración; d) moléculas de reducción ubicadas sobre o en dicha segunda trayectoria de migración, en donde dichas moléculas de reducción

incluyen un elemento de unión a ligando inmovilizado adaptado para unirse específicamente a segundos ligandos de un segundo virus que son diferentes, pero están emparentados con dicho primer ligando, ya que de dicho segundo virus pertenece al mismo género de dicho primer virus y dicho segundo ligando presenta reactividad cruzada con dicho primer ligando; e) un sitio (50) de prueba ubicado sobre o en al menos una de entre dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente, dicho sitio de prueba tiene un primer mecanismo de unión a ligando inmovilizado para dicho primer ligando; y f) dichas primeras y segundas tiras absorbentes se tocan entre sí en la ubicación del sitio de prueba, en donde dicha segunda ubicación se retira de dicho sitio de prueba, de modo que la muestra aplicada a dicha segunda ubicación requiere tiempo para migrar a dicho sitio de prueba y no humedece inmediatamente dicho sitio de prueba.

10 La descripción proporciona un dispositivo de cubetas de prueba de inmunoensayo de trayectoria doble para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, se proporciona con un primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal o lateral y un segundo material absorbente que define una segunda trayectoria de flujo horizontal o lateral, los primeros y segundos materiales absorbentes se solapan entre sí en el sitio de prueba. La primera trayectoria de flujo tiene una primera ubicación para recibir una primera disolución, que, en el caso de un sistema de conjugado líquido es una disolución de conjugado, y que, en el caso de un sistema de conjugado seco es una disolución de tampón. Cuando se utiliza una disolución de tampón, el primer material absorbente se proporciona con un primer conjugado (móvil) ubicado en sentido descendente de la primera ubicación. La segunda trayectoria de flujo tiene una segunda ubicación para recibir una segunda disolución que comprende una muestra. En una realización, la muestra es una muestra de sangre, orina, saliva u otra muestra que se pueda mezclar con una disolución de tampón si se desea, y las moléculas de unión al segundo ligando inmovilizadas se ubican en sentido descendente de la segunda ubicación. Las moléculas de unión al segundo ligando están emparentadas con el primer ligando para el que se somete a prueba la muestra, pero no son las mismas. El segundo material absorbente es distinto o está separado del primer material absorbente. El sitio de prueba se proporciona con moléculas de unión al primer ligando tales como antígenos o anticuerpos inmovilizados u otras moléculas tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas donde los primeros y segundos materiales absorbentes se cubren entre sí. Las moléculas de unión del primer ligando en el sitio de prueba se pueden disponer en una o más líneas u otros patrones distintivos. Una línea o sitio de control se puede proporcionar en sentido descendente desde el sitio de unión.

En una realización, las moléculas de unión al segundo ligando son segundos conjugados que incluyen moléculas de unión a ligando inmovilizadas conjugadas con partículas. En una realización, el segundo conjugado incluye antígenos conjugados con partículas. En una realización, las partículas conjugadas con los antígenos comprenden látex blanco. En otra realización, el segundo conjugado incluye anticuerpos conjugados con partículas. En una realización, las partículas conjugadas con los anticuerpos comprenden látex blanco. En una realización dirigida para detectar influenza ("gripe"), las moléculas de unión al segundo ligando incluyen antígenos de al menos un antígeno de influenza ("gripe") y el sitio de prueba se proporciona con un antígeno inmovilizado de al menos un antígeno de influenza diferente, pero emparentado con el al menos un antígeno de gripe del conjugado inmovilizado. En una realización, el primer conjugado es una disolución de oro conjugada con proteína A.

La descripción proporciona un dispositivo de cubetas de prueba de inmunoensayo de trayectoria doble para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, se proporciona con un primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal y un segundo material absorbente distinto del primer material absorbente que define una segunda trayectoria de flujo horizontal, los primeros y segundos materiales absorbentes se solapan entre sí en el sitio de prueba. La primera trayectoria de flujo tiene una primera ubicación para recibir una primera disolución, que, en el caso de un sistema de conjugado líquido es una disolución de conjugado, y que, en el caso de un sistema de conjugado seco es una disolución de tampón. Cuando se utiliza una disolución de tampón, el primer material absorbente se proporciona con un primer conjugado (móvil) ubicado en sentido descendente de la primera ubicación. La segunda trayectoria de flujo tiene una segunda ubicación para recibir una segunda disolución que comprende una muestra tal como sangre, orina, saliva u otra muestra que se ha mezclado previamente con las moléculas de unión al segundo ligando y, si se desea, un tampón y opcionalmente se filtra antes de ser aplicada como segunda disolución a la segunda ubicación. Cuando la muestra se ha mezclado con las moléculas de unión al segundo ligando y no se ha filtrado, en una realización, la segunda trayectoria de flujo puede incluir un filtro para la segunda disolución. Las moléculas de unión al segundo ligando están emparentadas con el primer ligando para el que se somete a prueba la muestra, pero no son las mismas y, en una realización, pueden incluir moléculas de unión a ligando inmovilizadas tales como antígenos o anticuerpos conjugados con partículas tales como látex. En una realización dirigida para detectar influenza ("gripe"), las moléculas de unión al segundo ligando incluyen antígenos de al menos un antígeno de influenza ("gripe") y el sitio de prueba se proporciona con un antígeno inmovilizado de al menos un antígeno de influenza diferente, pero emparentado con el al menos un antígeno de gripe del conjugado inmovilizado. En una realización, el sitio de prueba se proporciona con moléculas de unión al primer ligando tales como antígenos o anticuerpos inmovilizados u otras moléculas tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas donde los primeros y segundos materiales absorbentes se cubren entre sí. Las moléculas de unión del primer ligando en el sitio de prueba se pueden disponer en una o más líneas u otros patrones distintivos. Una línea o sitio de control se puede proporcionar en sentido descendente desde el sitio de unión.

Las moléculas de unión al segundo ligando se utilizan como mecanismo de reducción que captura y reduce así los anticuerpos (o antígenos) emparentados con los anticuerpos (o antígenos) que se van a detectar en el sitio de

- prueba. A modo de ejemplo, cuando el sitio de prueba incluye un antígeno de gripe A pandémica para identificar la presencia de un anticuerpo de gripe A en la muestra, el segundo conjugado se puede proporcionar con uno o más antígenos de gripe A y/o antígenos de gripe B común. De esta manera, los anticuerpos de gripe A y Gripe B común en la muestra que se pueden capturar de otro modo o retener en el sitio de prueba (debido a su estructura que puede ser similar de muchas formas a los anticuerpos de gripe A pandémica emparentados) se capturan generalmente por el segundo conjugado inmovilizado; es decir, el número de anticuerpos de gripe A y gripe B común que alcanzan el sitio de prueba se reduce. Como resultado, se aumenta la sensibilidad de la prueba.
- 5 El uso de un conjugado de látex blanco como el conjugado de reducción inmovilizado reduce la visibilidad del conjugado, se debería soltar y desplazar con la muestra hacia el sitio de prueba y llegar al sitio de prueba.
- 10 Cuando la cubeta de prueba se proporciona en una carcasa, la carcasa se proporciona con una primera abertura adyacente a la primera ubicación y una segunda abertura adyacente a la segunda ubicación. Una ventana de visualización se proporciona en la carcasa sobre la línea de prueba. De manera similar, una ventana de visualización se puede proporcionar en la carcasa sobre la línea de prueba.
- 15 Según un conjunto de realizaciones, los materiales absorbentes se disponen en forma de T, donde la primera ubicación para recibir el tampón o la disolución tampón-conjugado se ubica cerca de un extremo de la barra superior de la T, la segunda ubicación para recibir la muestra se ubica cerca del extremo del pie de la T, y los materiales absorbentes se cubren entre sí en la intersección. Evidentemente, los materiales absorbentes se pueden disponer en otras configuraciones, y la carcasa puede tomar otras formas, tales como rectangular, cuadrada, irregular, etc., independientemente de la manera en la que se dispongan los materiales absorbentes.
- 20 En una realización de la invención, los materiales, grosores y longitudes de los primeros y segundos materiales absorbentes se eligen para ajustar el momento adecuado en el que la muestra líquida y el tampón líquido alcanzan el sitio de prueba.
- En el sistema de conjugado seco, un primer conjugado seco se proporciona entre la primera abertura y el sitio de prueba. El primer conjugado se soporta sobre o dentro del material absorbente, de modo que cuando se añade un tampón en la primera abertura, el material absorbente absorbe el tampón al primer conjugado que es transportado a continuación por el tampón al sitio de prueba. En el sistema de conjugado líquido, un subsistema líquido tampón-conjugado se proporciona y aplica a la primera abertura. El material absorbente absorbe a continuación el subsistema tampón-conjugado al sitio de prueba.
- 25 La descripción proporciona un dispositivo de cubetas de prueba de inmunoensayo de trayectoria doble para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, se proporciona con un primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal y un segundo material absorbente distinto del primer material absorbente que define una segunda trayectoria de flujo horizontal, los primeros y segundos materiales absorbentes se solapan entre sí en el sitio de prueba. La primera trayectoria de flujo tiene una primera ubicación para recibir una primera disolución, que, en el caso de un sistema de conjugado líquido es una disolución de conjugado, y que, en el caso de un sistema de conjugado seco es una disolución de tampón. Cuando se utiliza una disolución de tampón, el primer material absorbente se proporciona con un primer conjugado (móvil) ubicado en sentido descendente de la primera ubicación. El primer conjugado incluye un marcador tal como un látex coloreado o partícula y un primer agente de unión provisional tal como (solo a modo de ejemplo) estreptavidina o un anticuerpo anti-biotina. La segunda trayectoria de flujo tiene una segunda ubicación para recibir una segunda disolución que comprende una muestra tal como sangre, orina, saliva u otra muestra que opcionalmente se ha mezclado previamente con las moléculas de unión al segundo ligando y, si se desea, tampón y se filtra opcionalmente para retirar las moléculas de unión al segundo ligando y el segundo ligando unido a las mismas antes de ser aplicada como segunda disolución a la segunda ubicación. La segunda trayectoria de flujo se proporciona con moléculas de unión al primer ligando inmovilizadas. Las moléculas de unión al primer ligando inmovilizadas pueden incluir un segundo conjugado de partículas de látex (por ejemplo, látex blanco) al que se unen los anticuerpos o antígenos y un segundo agente de unión provisional tal como biotina. De esta manera, cuando la muestra incluye el primer ligando, las moléculas de unión al primer ligando con el primer ligando y el segundo agente de unión provisional fijado al mismo son transportados por la disolución de muestra filtrada al sitio de prueba a lo largo de la segunda trayectoria de flujo. El sitio de prueba que se ubica donde los primeros y segundos materiales absorbentes se cubren entre sí se proporciona con un agente de unión inmovilizado que se une al antígeno o anticuerpos de la muestra. Por consiguiente, el ligando con el segundo agente de unión provisional se une al sitio de prueba y, cuando el primer conjugado se desplaza hacia la primera trayectoria de flujo con el látex coloreado o partícula y el primer agente de unión provisional, el agente de unión provisional se fijará y mantendrá el látex coloreado en el sitio de prueba. Una línea o sitio de control se puede proporcionar en sentido descendente desde el sitio de unión.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 Cuando la primera trayectoria de flujo se proporciona con un conjugado que tiene una segunda trayectoria de flujo, se proporciona con moléculas de unión al primer ligando inmovilizadas con un segundo agente de unión provisional y la primera línea de prueba se proporciona con un conjugado que tiene un primer agente de unión provisional, y la sensibilidad de la prueba se mejora.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para someter a prueba una muestra para la presencia de un primer ligando de un primer virus, que comprende: a) obtener un dispositivo (10) de prueba que tiene una primera tira (30) absorbente que tiene una primera ubicación (24) para recibir una disolución y definir una primera trayectoria de migración, un conjugado marcador ubicado sobre o en dicha primera trayectoria de migración, dicho conjugado marcador adaptado para unirse específicamente a dicho primer ligando, una segunda tira (32) absorbente distinta de dicha primera tira absorbente y que tiene una segunda ubicación (26) para recibir la muestra líquida y definir una segunda trayectoria de migración, moléculas de reducción ubicadas sobre o en dicha segunda trayectoria de migración, en donde dichas moléculas de reducción incluyen un elemento de unión a ligando inmovilizado adaptado para unirse a segundos ligandos de un segundo virus que son diferentes, pero están emparentados con dicho primer ligando, ya que de dicho segundo virus pertenece al mismo género de dicho primer virus y dicho segundo ligando presenta reactividad cruzada con dicho primer ligando, un sitio (50) de prueba ubicado sobre o en al menos una de entre dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente, dicho sitio de prueba tiene un primer mecanismo de unión a ligando inmovilizado para dicho primer ligando, y dichas primeras y segundas tiras absorbentes se tocan entre sí en la ubicación del sitio de prueba, en donde dicha segunda ubicación se retira de dicho sitio de prueba, de modo que la muestra aplicada a dicha segunda ubicación requiere tiempo para migrar a dicho sitio de prueba y no humedece inmediatamente dicho sitio de prueba; b) aplicar la muestra a dicha segunda ubicación; c) después de dicha aplicación de la muestra, aplicar una disolución a la primera ubicación para provocar que dicho conjugado marcador migre a lo largo de dicha primera trayectoria de migración; y d) examinar dicho sitio de prueba para determinar una indicación de la presencia del primer ligando en la muestra o la ausencia del mismo.

Según esta descripción, se proporciona un sistema para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra e incluye una cubeta de prueba que tiene un primer material absorbente que tiene una primera ubicación para recibir una disolución de tampón (en el caso de un sistema de conjugado seco) o una disolución de conjugado (en el caso de un sistema de conjugado líquido) con el primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal y un segundo material absorbente que tiene una segunda ubicación para recibir una muestra y definir una segunda trayectoria de flujo horizontal distinta de la primera trayectoria de flujo, con el segundo material absorbente que tiene moléculas de unión a un segundo ligando ubicadas en sentido descendente de la segunda ubicación, y una línea de prueba o sitio de prueba con moléculas de unión al primer ligando inmovilizadas tales como antígenos, anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas en una zona de prueba en una zona de unión de los primeros y segundos materiales absorbentes. Si se desea, se proporciona también una carcasa que tiene una primera abertura para recibir la disolución de tampón o conjugado, una segunda abertura para recibir la muestra y una ventana de visualización sobre la línea de prueba. Una muestra de interés se proporciona en la segunda abertura o ubicación y se permite que migre hacia la línea de prueba con el paso del tiempo. Después de una cantidad de tiempo deseada, un líquido tal como una disolución de tampón se añade a la primera abertura o ubicación. Si el primer material absorbente soporta un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado seco), el líquido puede ser simplemente una disolución de tampón. Si el primer material absorbente no soporta un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado líquido), el líquido puede ser un subsistema líquido tampón-conjugado. En cualquier caso, después de suficiente tiempo para permitir que el primer conjugado migre al sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona), el sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona) se examina para determinar si la muestra es "positiva" o no.

Según esta descripción, se proporciona un sistema para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra e incluye una cubeta de prueba que tiene un primer material absorbente que tiene una primera ubicación para recibir una disolución de tampón (en el caso de un sistema de conjugado seco) o una disolución de conjugado (en el caso de un sistema de conjugado líquido) con el primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal y un segundo material absorbente que tiene una segunda ubicación para recibir una muestra y definir una segunda trayectoria de flujo horizontal distinta de la primera trayectoria de flujo con un filtro opcional, y una línea de prueba o sitio de prueba con moléculas de unión al primer ligando inmovilizadas tales como antígenos, anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas en una zona de prueba en una zona de unión de los primeros y segundos materiales absorbentes. Si se desea, se proporciona también una carcasa que tiene una primera abertura para recibir la disolución de tampón o conjugado, una segunda abertura para recibir la muestra y una ventana de visualización sobre la línea de prueba. Una muestra de interés se proporciona a una cámara de mezcla que tiene moléculas de unión al segundo ligando y un tampón opcional. La muestra se mezcla con las moléculas de unión al segundo ligando (y tampón) y, opcionalmente, se filtra para retirar las moléculas de unión al segundo ligando y el segundo ligando fijado a las mismas si la segunda trayectoria de flujo no tiene filtro. La muestra opcionalmente filtrada se proporciona en la segunda abertura o ubicación y se permite que migre a lo largo de la segunda trayectoria de flujo hacia el sitio de prueba. Después de una cantidad de tiempo deseada, un líquido tal como una disolución de tampón se añade a la primera abertura o ubicación. Si el primer material absorbente soporta un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado seco), el líquido puede ser simplemente una disolución de tampón. Si el primer material absorbente no soporta un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado líquido), el líquido puede ser un subsistema líquido tampón-conjugado. En cualquier caso, después de suficiente tiempo para permitir que el primer conjugado migre al sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona), el sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona) se examina para determinar si la muestra es "positiva" o no.

Según esta descripción, se proporciona un sistema para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra e incluye una cubeta de prueba que tiene un primer material absorbente que tiene una primera ubicación para recibir

una disolución de tampón (en el caso de un sistema de conjugado seco) o una disolución de conjugado (en el caso de un sistema de conjugado líquido) con el primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal para un primer conjugado que tiene un marcador y un primer agente de unión provisional, y un segundo material absorbente que tiene una segunda ubicación para recibir una muestra y definir una segunda trayectoria de flujo horizontal distinta de la primera trayectoria de flujo con moléculas de unión al primer ligando inmovilizadas tales como anticuerpo o antígeno unidas a un segundo agente de unión provisional, y una línea de prueba o sitio de prueba con agente de unión inmovilizado ubicada en una zona de prueba en una zona de unión de los primeros y segundos materiales absorbentes. Si se desea, se proporciona también una carcasa que tiene una primera abertura para recibir la disolución de tampón o conjugado, una segunda abertura para recibir la muestra y una ventana de visualización sobre la línea de prueba. Una muestra de interés se proporciona opcionalmente en una cámara de mezcla que tiene moléculas de unión al segundo ligando y un tampón opcional. La muestra se puede mezclar con las moléculas de unión al segundo ligando (y tampón) y filtrar para retirar las moléculas de unión al segundo ligando y el segundo ligando fijado a las mismas. La muestra opcionalmente filtrada se proporciona en la segunda abertura o ubicación y puede interactuar a continuación con un segundo conjugado que tiene un segundo agente de unión provisional a medida que migra a lo largo de la segunda trayectoria de flujo hacia el sitio de prueba. Después de una cantidad de tiempo deseada, un líquido tal como una disolución de tampón se añade a la primera abertura o ubicación. Si el primer material absorbente soporta un primer conjugado (es decir, en un sistema de conjugado seco), el líquido puede ser simplemente una disolución de tampón. Si el primer material absorbente no soporta un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado líquido), el líquido puede ser un subsistema líquido tampón-conjugado que contiene el primer conjugado. En cualquier caso, después de suficiente tiempo para permitir que el segundo conjugado migre al sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona), el sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona) se examina para determinar si la muestra es "positiva" o no.

Se apreciará que los sistemas se pueden utilizar en conjunción con diferentes tipos de muestras tales como sangre, orina, saliva, etc. La muestra se puede diluir o mezclar con tampón antes de ser añadida a través del segundo orificio. De manera alternativa, en algunos casos, la muestra se puede añadir a través del orificio y, a continuación, se puede añadir un diluyente a través del mismo orificio.

Los objetos y ventajas resultarán evidentes a los expertos en la técnica sobre la referencia a la descripción detallada tomada en conjunción con las figuras proporcionadas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática superior de una primera realización.

La Figura 1A es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 1A-1A de la Figura 1.

La Figura 1B es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 1B-1B de la Figura 1.

La Figura 2A es una gráfica que compara los resultados de prueba del aparato de la Figura 1 frente a los resultados de prueba de un aparato de plataforma de trayectoria doble estándar y que muestra la reducción de anticuerpos de gripe no pandémica por medio del aparato de la Figura 1.

La Figura 2B es una gráfica que compara los resultados de prueba del aparato de la Figura 1 frente a los resultados de prueba de un aparato de plataforma de trayectoria doble estándar y que muestra la no reducción de anticuerpos de gripe B por medio del aparato de la Figura 1.

La Figura 3 es un diagrama que muestra un kit que incluye un vial de agua, un vial con conjugado, un vial con diluyente, un dispositivo de extracción sanguínea y transferencia, tres pipetas de transferencia y una cámara de filtro.

La Figura 4A es un diagrama que representa una primera realización alternativa.

La Figura 4B es un diagrama que representa una segunda realización alternativa.

La Figura 4C es un diagrama que representa una tercera realización alternativa.

Descripción detallada de la invención

De vuelta ahora a las Figuras 1, 1A y 1B, se proporciona una cubeta 10 de prueba de dispositivo de inmunoensayo para someter a prueba la presencia de un primer ligando en una muestra e incluye una carcasa 20 que tiene una pared 21 superior que define primeros y segundos orificios 24, 26 y una ventana 28 y primeros y segundos materiales 30, 32 absorbentes o porosos que definen trayectorias de flujo horizontales o laterales perpendiculares en la carcasa. El primer material 30 absorbente incluye una pluralidad de zonas y se puede fabricar a partir de una pluralidad de materiales. Una primera zona 31 (denominada a veces como zona de filtro) se ubica en el primer orificio 24 y se extiende hacia una segunda zona 33 (denominada a veces como zona de prueba) que se ubica en la zona de unión de una "T". La primera zona 31 incluye preferiblemente un filtro 31a, una almohadilla 31b sobre o en la que se deposita e inmoviliza un conjugado 39 que tiene antígenos o anticuerpos deseados con marcadores

coloreados fijados, una primera porción de una membrana delgada o material 30 absorbente o poroso fabricado típicamente a partir de nitrocelulosa con un refuerzo de plástico (no mostrado). En una realización, y solo a modo de ejemplo, el conjugado 39 puede ser una disolución de oro conjugada con una proteína A. La primera zona 31 se adapta para recibir una disolución de tampón, para provocar que la disolución de tampón entre en contacto con el conjugado, movilizándolo así el conjugado, y para absorber la disolución de tampón que tiene conjugado a la segunda zona 33. La segunda zona 33 (de prueba) incluye una segunda porción de la membrana 30 delgada que se puede imprimir con una línea 50 de prueba que tiene moléculas de unión al primer ligando inmovilizadas tales como antígenos o anticuerpos (dependiendo de si la cubeta de prueba se diseña para someter a prueba la presencia de anticuerpos o antígenos) sobre la membrana tal como se conoce en la técnica. La línea 50 de prueba se puede ver a través de la ventana 28 de plástico transparente proporcionada en la carcasa. Una tercera zona 35 (denominada a veces como zona de control) que incluye una tercera porción de la membrana 30 delgada se puede imprimir también con una línea 60 de control que contiene típicamente anticuerpos contra los antígenos conjugados (o, en algunos casos, anticuerpos que se unirán a anticuerpos conjugados o, incluso, antígenos que se unirán a anticuerpos conjugados) tal como se conoce en la técnica. Cuando se proporciona la tercera zona 35, la ventana 28 se extiende sobre la línea 60 de control. Si se desea, una cuarta zona 37 (denominada a veces como zona de depósito) se puede proporcionar como depósito de absorción tal como se conoce también en la técnica. La cuarta zona 37 incluye un papel absorbente relativamente grueso. Preferiblemente, hay una película o tarjeta 38a de plástico delgado preferiblemente transparente que cubre todas las zonas que tiene un adhesivo que mantiene los materiales absorbentes en su lugar. La tarjeta 38a se puede cortar con una abertura en un orificio 24, de modo que no se bloquee el acceso de líquido al orificio 24.

El segundo material 32 absorbente se puede fabricar también a partir de una pluralidad de materiales e incluye una pluralidad de zonas. La primera zona 62 (denominada a veces como zona de filtro) incluye un filtro o almohadilla 32a y una almohadilla 32b sobre o en la que se proporcionan e inmovilizan moléculas de unión al segundo ligando, donde el segundo ligando es diferente, pero está emparentado con el primer ligando, y una primera porción de una membrana delgada o material 32 absorbente o poroso fabricado típicamente a partir de nitrocelulosa con un refuerzo (no mostrado). Las moléculas de unión al segundo ligando pueden incluir antígenos o anticuerpos u otras moléculas tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc. que se unen a ligandos que son similares, pero diferentes que los primeros ligandos. Las moléculas de unión al segundo ligando se pueden proporcionar como conjugado 41 que tiene antígenos o anticuerpos deseados con partículas fijadas. La primera zona 62 se ubica en el segundo orificio 26 que se extiende hacia la segunda zona 63. La segunda zona 63 incluye una segunda porción de la membrana 32 delgada que está en contacto con la segunda zona 33 del primer material 30 absorbente. Como se ve en las Figuras 1A y 1B, el primer material 30 absorbente cubre el segundo material 32 absorbente, de modo que las membranas estén en contacto entre sí (como oposición a los refuerzos que están en contacto con las membranas o entre sí), y de modo que la línea 50 de prueba se ubique eficazmente entre las membranas. Por consiguiente, la línea 50 de prueba se podría imprimir sobre la segunda zona 63 del segundo material 32 absorbente en lugar de, o además de, en la segunda zona 33 del primer material 30 absorbente. Si se desea, se puede utilizar una película o tarjeta 38b de plástico delgado que tiene un adhesivo que mantiene el segundo material absorbente en su lugar. Con la disposición proporcionada, la muestra tarda en desplazarse desde su punto de aplicación hacia la segunda zona 63 y el sitio de prueba, y la aplicación de la muestra a la segunda trayectoria de flujo no humedece inmediatamente el sitio de prueba.

En una realización, el conjugado 41 sobre la almohadilla 32b de conjugado incluye antígenos conjugados con una partícula que no es fácilmente visible por el ojo humano contra el fondo del área de prueba. En una realización, la partícula es un látex blanco. Una realización de un látex blanco es una perla de látex blanco de 0,32 micras disponible de Thermo Fisher Scientific, Inc., Holtville, Nueva York. EE. UU. Los antígenos del conjugado 41 son diferentes, pero están emparentados con los antígenos de la línea 50 de prueba. A modo de ejemplo solo, en una realización dirigida para detectar influenza ("gripe") pandémica, el segundo conjugado incluye antígenos de al menos un antígeno de influenza ("gripe") (por ejemplo, dos antígenos diferentes de gripe A tales como los antígenos de gripe H1 y H3) y el sitio de prueba se proporciona con un antígeno inmovilizado de al menos un antígeno de influenza pandémica de interés que es diferente, pero está emparentado con el al menos un antígeno de gripe del conjugado 41 inmovilizado. En otra realización, el segundo conjugado incluye anticuerpos conjugados con látex blanco y el sitio 50 de prueba incluye anticuerpos diferentes, pero emparentados con los anticuerpos del conjugado 41.

En un aspecto, el segundo conjugado se utiliza como mecanismo de reducción que captura y reduce así los anticuerpos emparentados con los anticuerpos que se van a detectar en el sitio de prueba. A modo de ejemplo, cuando el sitio de prueba incluye un antígeno de gripe B para identificar la presencia de un anticuerpo de gripe B en la muestra, el segundo conjugado se puede proporcionar con uno o más antígenos de gripe A; es decir, puede existir una pluralidad de segundos conjugados ligeramente diferentes. De esta manera, los anticuerpos de gripe A en la muestra que se pueden capturar de otro modo o retener en el sitio de prueba (debido a su estructura que puede ser similar de muchas formas a los anticuerpos de gripe B emparentados) se capturan generalmente por el segundo conjugado inmovilizado; es decir, el número de anticuerpos de gripe A que alcanza el sitio de prueba se reduce. Como resultado, se aumenta la sensibilidad de la prueba. Se apreciará que el sitio de prueba podría incluir un antígeno de gripe A para identificar la presencia de un anticuerpo de gripe A particular en la muestra, y el segundo conjugado se puede proporcionar con uno o más antígenos de gripe B y uno o más antígenos de gripe A que son

diferentes, pero están emparentados con el antígeno de gripe A particular en el sitio de prueba. Además, se apreciará que el sitio de prueba se puede proporcionar con más de una línea de prueba, que contiene diferentes antígenos de gripe. Esos antígenos de gripe podrían incluir una pluralidad de antígenos de gripe A, una pluralidad de antígenos de gripe B o uno o más antígenos de gripe A y uno o más de gripe B. El segundo conjugado inmovilizado se ajustará de manera acorde para incluir un conjugado que reducirá esos antígenos que están emparentados con los antígenos de las líneas de prueba, pero que no son materia de la prueba.

En un aspecto, el uso de un conjugado de látex blanco como el conjugado de reducción inmovilizado reduce la visibilidad del conjugado, se debería soltar y desplazar con la muestra hacia el sitio de prueba y se captura en el sitio de prueba. En otro aspecto, las perlas de látex de un tamaño mayor que el tamaño de poro de la segunda trayectoria de migración se pueden utilizar para evitar el movimiento del conjugado a lo largo de la segunda trayectoria de migración.

Cuando se utilizan tiras de nitrocelulosa de tipo estándar con un refuerzo como las primeras y segundas membranas, las membranas pueden tener diferentes tamaños de poro. Por ejemplo, si la membrana 31 (para la primera migración del conjugado) tiene un tamaño de poro de  $3\ \mu$  y la membrana 32 (para la migración de la muestra) tiene un tamaño de poro de  $15\ \mu$ , la muestra aplicada a la membrana 32 tenderá a migrar y permanecer en la membrana 32 de muestra y tenderá a no migrar a la membrana 31 de conjugado.

El inmunoensayo de las Figuras 1, 1A y 1B se utiliza preferiblemente como sigue. En primer lugar, una muestra (no mostrada) que contiene posiblemente anticuerpos (o antígenos) se diluye (por ejemplo, con tampón) opcionalmente y se proporciona en la segunda abertura u orificio 26. La muestra no humedece inmediatamente el sitio de prueba, pero se le permite tardar para migrar desde la almohadilla 32a hacia la almohadilla 32b de conjugado y, a continuación, desde la zona 61 del segundo material 32 absorbente hacia su segunda zona 63 que está en contacto con la segunda zona 33 del primer material 30 absorbente. Si la muestra no se ha diluido primero, opcionalmente, después de proporcionar la muestra en el orificio 26, una cantidad medida de líquido tal como una disolución de tampón se puede añadir al orificio 26 para ayudar en la migración de la muestra. En cualquier caso, si la muestra incluye antígenos o anticuerpos que reaccionan con el segundo conjugado 41 de la almohadilla 32b de conjugado, esos antígenos o anticuerpos se capturan por el conjugado 41 y se reducen de la muestra antes de alcanzar la línea 50 de prueba que se imprime sobre la segunda zona 33 del primer material absorbente o se infunde en el mismo. En el punto en el que el conjugado 41 se suelta de la almohadilla 32b y se desplaza a lo largo de la membrana 32 hacia el sitio de prueba y se captura ahí, el conjugado 41 no será particularmente visible porque las partículas de látex blanco no se verán sobre el fondo blanco del sitio de prueba. En cualquier caso, después de una cantidad deseada de tiempo, momento en el que los anticuerpos (o antígenos) en la muestra (si están presentes) tendrán una oportunidad de unirse a los antígenos (o anticuerpos) inmovilizados en la línea 50 de prueba, un líquido tal como una disolución de tampón (no mostrada) se añade a la primera abertura 24. Después de otro periodo de tiempo, suficiente para permitir que la disolución de tampón provoque que el conjugado migre al sitio 50 de prueba (y al sitio 60 de control si se proporciona) y se una con los antígenos (y anticuerpos) de la muestra que se captura en el sitio 50 de prueba (si lo hay), el sitio de prueba (y el sitio 60 de control si se proporciona) se examina por medio de la ventana 28 para determinar si la muestra es "positiva" o no. Típicamente, una prueba "positiva" que indica la presencia del anticuerpo (o antígeno) en la muestra se obtiene cuando tanto el sitio 50 de prueba como el sitio 60 de control muestran líneas de color. Una prueba "negativa" que indica la falta de la presencia del anticuerpo (o antígeno) en la muestra se obtiene solo cuando el sitio 60 de control muestra una línea de color.

El uso del aparato se puede acelerar al proporcionar la carcasa con números y/o letras que indiquen que el orificio 26 es para recibir la muestra (y opcionalmente un poco de tampón) y se va a utilizar primero, y que el orificio 24 es para recibir la disolución de tampón y se utiliza en segundo lugar.

Los expertos en la técnica apreciarán que el inmunoensayo 10 funciona como sigue. Debido a que la línea 50 de prueba se proporciona con antígenos (o anticuerpos) inmovilizados sobre una membrana, si la muestra de prueba contiene anticuerpos contra los antígenos (o antígenos contra los anticuerpos), los anticuerpos (o antígenos) se unirán ellos mismos a los antígenos (o anticuerpos) en la línea de prueba. Debido a que la muestra de prueba pasa a través de una almohadilla 32b de conjugado que tiene un segundo conjugado 41 inmovilizado con antígenos (o anticuerpos) que están emparentados, pero son diferentes que los antígenos (o anticuerpos) de la línea de prueba, los anticuerpos o antígenos emparentados con los que se van a someter a prueba, si están presentes, se capturarán por el conjugado 41 y se mantendrán por la almohadilla 32b de conjugado y, cuando la muestra de prueba alcance la línea de prueba, los anticuerpos (o antígenos) de la muestra, si están presentes, se unirán al antígeno (o anticuerpo) en la línea de prueba. Debido a que los anticuerpos (o antígenos) emparentados se reducen, no alcanzarán la línea de prueba y, si lo hacen, ya estarán conjugados con un látex que reducirá su actividad en el sitio de prueba. En cualquier caso, el sitio de prueba será más específico a los anticuerpos o antígenos cuya presencia se va a detectar. Después de que la muestra haya alcanzado el sitio de prueba, se provoca que el primer conjugado 39 que contiene un antígeno para el anticuerpo (o un anticuerpo para el antígeno) acoplado a un marcador coloreado migre a la línea de prueba. Si la muestra de prueba contiene los anticuerpos (o antígenos) que se mantienen ahora en la línea 50 de prueba, el antígeno (o anticuerpo) del conjugado se unirá él mismo a los anticuerpos (o antígenos) y el marcador coloreado provocará que aparezca una línea coloreada en el sitio 50 de prueba. Si la muestra de prueba no contiene anticuerpos (o antígenos), el conjugado no tendrá los anticuerpos (o antígenos) para unirse a la línea 50 de prueba, y no aparecerá una línea coloreada en el sitio 50 de prueba. Por otro



lado, debido a que la línea 60 de control se proporciona con anticuerpos (o antígenos), los antígenos (o anticuerpos) del conjugado siempre se unirán a los anticuerpos (o antígenos) de la línea 60 de control, provocando así que aparezca una línea coloreada en el sitio 60 de control si el conjugado alcanza del sitio 60 de control. Por consiguiente, si se proporciona suficiente disolución de tampón en la cubeta de prueba, una línea coloreada debería aparecer siempre en el sitio 60 de control, proporcionando así un control para la prueba.

Volviendo a la Figura 2A, se puede ver que el aparato de las Figuras 1, 1A y 1B puede proporcionar resultados de prueba mejorados en relación a un aparato de plataforma de trayectoria doble estándar tal como se describe y muestra en la patente estadounidense N.º 7.189.522. En particular, tres conjuntos de cinco aparatos de prueba tales como los descritos anteriormente con referencia a las Figuras 1, 1A y 1B se prepararon con una segunda almohadilla 32b de conjugado proporcionada con un conjugado 41 que tenía antígeno de gripe A H3 y H1 conjugado con perlas, y se proporciona una línea de prueba DPP con antígenos de gripe A. Un conjunto de cinco aparatos utilizaron perlas magnéticas por separado conjugadas con antígeno H1 y antígeno H3 (H1 + H3 Mag). Un segundo conjunto utilizó perlas de látex por separado conjugadas con antígeno H1 y H3 (H1 + H3 Látex). Un tercer conjunto utilizó perlas de látex con conjugación de H1 y H3 combinados (H1/H3 Látex). De manera similar, un conjunto de dispositivos tales como los descritos y mostrados en la patente estadounidense N.º 7.189.522 se proporcionan (No Ad) con una línea de prueba que tiene los mismos antígenos de gripe A. Se prepararon y se aplicaron muestras de prueba a partir de cinco individuos diferentes que tenían anticuerpos H3 a las segundas trayectorias de flujo de los conjuntos de dispositivos descritos anteriormente con referencia a las Figuras 1, 1A y 1B y el conjunto de dispositivos de la patente estadounidense N.º 7.189.522. Después de esperar a que las muestras alcanzaran los sitios de prueba, se añadió tampón a la primera trayectoria de migración de cada dispositivo para mover el conjugado marcador hacia los sitios de prueba. La intensidad de las señales en cada sitio de prueba se midió y se representó en un gráfico. Como se ve en la Figura 2A, las líneas de prueba de cinco aparatos de plataforma de trayectoria doble estándar (No Ad) mostraron una intensidad relativa (con un lector digital) que oscilaba de entre 700 a muy por encima de 4000 en comparación con una intensidad relativa de casi cero del aparato de las Figuras 1, 1A y 1B que utiliza perlas para las perlas magnéticas y de látex. Estas pruebas muestran que el aparato de la Figura 1 consigue reducir los anticuerpos de gripe A al utilizar el conjugado de antígeno de gripe A-partícula en la trayectoria de flujo de la muestra. Cuando se utilizaron partículas blancas, hasta el punto en que cualquier conjugado de antígeno de gripe A-partícula se transportó hasta el sitio de prueba y se capturó ahí, la partícula blanca evita que el conjugado se vea contra el fondo blanco de la tarjeta 38b sobre el que se ubica la línea 50 de prueba. Se debería apreciar que al reducir la gripe A H1 y H3 (gripe estacional) con el sistema de conjugado de látex en la trayectoria de la muestra, la sensibilidad y especificidad de la prueba con una línea de prueba para gripe A pandémica aumentará debido a la eliminación de la reactividad cruzada entre los antígenos de gripe A estacional y pandémica.

En una realización, el conjugado en la trayectoria de flujo de la muestra utiliza fragmentos o fracciones de gripe H1 y H3 estacional conjugados con partículas de látex. Los fragmentos son porciones inmunodominantes de la partícula que no reaccionarán de manera cruzada sustancialmente con otros antígenos de gripe y son diferentes de los anticuerpos H1 y H3 que se podrían utilizar como anticuerpos de captura en el sitio de prueba en la membrana (la molécula completa de H1 y H3). Como resultado, cuando se proporciona una prueba para gripe pandémica con una línea de prueba que incluye anticuerpos de gripe pandémica, los conjugados de fragmentos H1 y H3 tendrán reactividad cruzada mínima con antígenos de gripe pandémica, lo que da lugar a una mejor detección de una gripe pandémica en la línea de prueba.

Volviendo a la Figura 2b, se prepararon otras muestras que tenían anticuerpos de gripe B/Bris. Las muestras se aplicaron a conjuntos de los aparatos de plataforma de trayectoria doble estándar tales como los descritos en la patente estadounidense N.º 7.189.522, donde la línea de prueba tuvo antígeno de gripe B/Bris (No Ad), y a los conjuntos de dispositivos tales como los mostrados en las Figuras 1, 1A y 1B, donde la segunda almohadilla 32b de conjugado se proporcionó un conjugado 41 que tenía antígenos de gripe A H1 y H3 conjugados con perlas, y a una línea de prueba proporcionada con antígenos de gripe B/Bris. Como en las pruebas de la Figura 2A, un conjunto de aparatos utilizó perlas magnéticas por separado conjugadas con H1 y H3 (H1 + H3 Mag), un segundo conjunto utilizó perlas de látex blanco de 0,32 micras por separado conjugadas (H1 + H3 Látex), mientras que un tercer conjunto utilizó las perlas de látex blanco con conjugación (H1/H3 Látex) combinada. Como se ve en la Figura 2B, los resultados positivos en la línea de prueba del aparato 10 de la Figura 1 son tan fuertes como las líneas de prueba del aparato de plataforma de trayectoria doble estándar que muestra que el conjugado 41 ubicado en la segunda trayectoria de migración no interfirió con los resultados, ya que las señales en las líneas de prueba fueron casi las mismas para todas las pruebas de una muestra particular. Tomando las Figuras 2A y 2B juntas, se apreciará que el aparato 10 de las Figuras 1, 1A y 1B tiene mayor sensibilidad.

De vuelta ahora a la Figura 3, un kit 100 se ve que incluye un vial 101 de agua con agua 102, un vial 103 con conjugado 104 de látex liofilizado, un vial 105 de diluyente con un diluyente 106, un dispositivo 107 de extracción sanguínea y transferencia, cuatro pipetas 108a, 108b, 108c, 108d de transferencia y un conjunto 109 de cámara de filtro. Se apreciará que el kit podría tener diferentes números de elementos. Por consiguiente, en lugar de mantener agua y conjugado de látex liofilizado por separado, un conjugado de látex "húmedo" se puede almacenar utilizando agua y/o diluyente. Asimismo, en lugar de mantener un vial de diluyente, se puede proporcionar diluyente como parte del conjugado de látex "húmedo". También, en lugar de utilizar cuatro pipetas de transferencia, se pueden utilizar menos elementos de transferencia. En una realización, el kit 100 se puede utilizar en conjunción con una cubeta de prueba de dispositivo de inmunoensayo como el dispositivo 10 de las Figuras 1, 1A y 1B. En otra

realización, el kit 100 se puede utilizar en conjunción con otros dispositivos de inmunoensayo tales como ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática). En otra realización, el kit 100 se puede utilizar en conjunción con una cubeta de prueba de dispositivo de inmunoensayo como el descrito en la patente estadounidense N.º 7.189.522.

5 Más particularmente, el agua 102 en el vial 101 se puede mezclar con el conjugado 104 de látex liofilizado en el vial 103 al usar una pipeta 108a y transferir el agua al vial de látex. El vial 103 se puede invertir múltiples veces para provocar que el conjugado de látex liofilizado se reconstituya. El látex reconstituido se puede almacenar en un frigorífico si se desea. En una realización, el conjugado de látex liofilizado es un conjugado de uno o más antígenos de gripe tales como H1 y H3 con microperlas de látex. Las perlas de látex pueden ser de un color fácilmente visible, por ejemplo, azul.

10 Cuando se desea someter a prueba una muestra, la muestra, por ejemplo, sangre, se puede obtener de un paciente de una manera deseada, por ejemplo, una punción digital, utilizando un dispositivo 107 de extracción sanguínea y transferencia tal como Minivette POCT fabricado por Sarstedt, Newton, Carolina del Norte, EE. UU. La muestra de sangre se puede transferir al vial 105 de diluyente que contiene un diluyente 106 tal como heparina o EDTA. El conjugado de látex reconstituido se puede transferir a continuación al vial 105 de diluyente utilizando una pipeta 15 108b, y la sangre y el conjugado de látex reconstituido se pueden mezclar al invertirlo múltiples veces durante un periodo de tiempo y también al dar a los anticuerpos en la sangre una oportunidad de ser capturados por el conjugado de látex. Después de un mezclado suficiente y de un periodo de tiempo suficiente, el contenido del vial 105 de diluyente de muestra se pueden transferir a continuación con la pipeta 108c a una cámara 109 de filtro tal como una cámara de filtro Mini-UniPrep de GE Healthcare Life Sciences que comprende un filtro 109a, un compresor 109b, un émbolo 109c y un tubo 109d, aunque se podrían utilizar otros mecanismos de filtro. Utilizando el 20 compresor 109b de manivela de la cámara de filtro, el filtro 109a se puede precipitar en la mezcla de muestra, y la muestra filtrada se puede recoger en el tubo 109d de la cámara de filtro. Se apreciará que el filtro se elige para que tenga poros que son más pequeños que el tamaño de las perlas del conjugado de látex. Como resultado, las perlas de conjugado (con anticuerpos capturados, si los hay) se filtran fuera de la muestra y la muestra (con anticuerpos que no se han capturado por el conjugado) con el diluyente y agua añadidos previamente se atraparán en el tubo 25 109d. Por consiguiente, mientras que el contenido del vial 105 de diluyente de muestra que se transfirió a la cámara 109 de filtro puede haber parecido que es azul oscuro (debido al conjugado de látex azul oscuro y la sangre), el contenido del tubo 109d debería ser rojo claro (el color de sangre diluida). En cualquier caso, se apreciará que los ligandos que están emparentados, pero que no son los mismos que los ligandos de interés se habrán retirado de la 30 muestra.

El contenido del tubo 109d se transfiere a continuación por la pipeta 108d y se utiliza en conjunción con un dispositivo de inmunoensayo. En una realización, el dispositivo de inmunoensayo es, de otro modo, un dispositivo de tipo de la técnica anterior tal como ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática) o un ensayo LUMINEX vendido por Thermo Fisher Scientific, Holtsville, Nueva York, EE. UU. Cuando se proporciona una muestra que se procesa 35 de esta manera, los resultados de los dispositivos ELISA y LUMINEX se mejoran. En otra realización, el dispositivo de inmunoensayo al que se transfiere el contenido del tubo 109d es una cubeta de prueba de dispositivo de inmunoensayo tal como la descrita en la patente estadounidense N.º 7.189.522 tal como al aplicar una cantidad seleccionada del contenido a la (segunda) ubicación para recibir la muestra líquida, esperar a que la muestra líquida alcance el sitio de prueba por medio de la segunda trayectoria de migración y, a continuación, aplicar tampón o un subsistema de tampón-conjugado a la primera ubicación para provocar que un conjugado alcance el sitio de prueba 40 por medio de la primera trayectoria de migración. Cuando se proporciona una muestra que se procesa tal como se describió previamente, los resultados del dispositivo descrito en la patente estadounidense N.º 7.189.522 se mejoran.

En otra realización, en lugar de utilizar un kit 100 con elementos tales como un vial de agua, un vial con conjugado 45 de látex liofilizado, un vial de diluyente, un conjunto de cámara de filtro, etc., el kit incluye un conjugado que se puede mantener en una forma húmeda con o sin tampón, o se puede mantener en un formato de conjugado liofilizado que se puede reconstituir con agua y/o una disolución de tampón. En una realización, el conjugado de látex comprende perlas de látex blanco con anticuerpos o antígenos conjugados con las mismas. La muestra y el conjugado se mezclan juntos para permitir que el conjugado reduzca los antígenos y anticuerpos que interfieren. La 50 muestra mezclada y el conjugado se pueden aplicar a continuación a una cubeta de prueba de dispositivo de inmunoensayo tal como se describe en la patente estadounidense N.º 7.189.522 tal como al aplicar una cantidad seleccionada del contenido a la (segunda) ubicación para recibir la muestra líquida, esperar a que la muestra mezclada y el conjugado alcancen el sitio de prueba por medio de la segunda trayectoria de migración y, a continuación, aplicar tampón o un subsistema de tampón-conjugado a la primera ubicación para provocar que un 55 conjugado alcance el sitio de prueba por medio de la primera trayectoria de migración. Cuando se proporciona una muestra que se procesa tal como se describió previamente, los resultados del dispositivo descrito en la patente estadounidense N.º 7.189.522 se mejoran.

De vuelta a las Figuras 4A-4C, se proporcionan realizaciones adicionales que dan lugar a un aparato que tiene una señal de prueba mejorada. Las Figuras 4A-4C se describen con referencia a los dispositivos de prueba de VIH, 60 aunque no se limitan a los mismos. Las realizaciones de las Figuras 4A y 4B son similares a las de las Figuras 1, 1A y 1B excepto en que los conjugados proporcionados en las almohadillas 31b y 32b son diferentes, y el antígeno de la línea de prueba inmovilizado es un anticuerpo de VIH en lugar de un anticuerpo de gripe. Más particularmente, en

la Figura 4A, el conjugado 41a en la trayectoria 32 de migración de muestra incluye una partícula de látex (por ejemplo, un látex blanco) con la que se conjugan un anticuerpo AcM-1 p24 y un primer agente de unión provisional (por ejemplo, antígeno de biotina). La línea 50 de prueba se proporciona con una proteína de anticuerpo monoclonal anti-VIH (AcM-2 p24). El subsistema de tampón-conjugado de la primera trayectoria 30 de migración se proporciona con un conjugado 39a que incluye un marcador (por ejemplo, látex azul o disolución de oro) y un segundo agente de unión provisional (por ejemplo, estreptavidina) conjugado con el mismo que se elige para unirse al primer agente de unión provisional. Con el sistema proporcionado, cuando una muestra que contiene antígeno de VIH p24 se añade al aparato de prueba a través del orificio 26, el antígeno de VIH p24 en la muestra se unirá al AcM-1 p24 del conjugado, y la muestra con el antígeno de interés unido al conjugado se desplazará hacia la línea 50 de prueba, donde el antígeno p24 de la muestra será atrapado por el anticuerpo AcM-2 p24 en la línea de prueba. Cuando se añade tampón a la primera tira absorbente a través del orificio 24, el conjugado marcador se moverá hacia la línea de prueba, donde el primer agente de unión provisional se unirá con el segundo agente de unión provisional, y el marcador aparecerá en la línea de prueba.

La realización de la Figura 4B es muy similar a la realización de las Figuras 4A, excepto en que en lugar de ser el segundo agente de unión provisional del conjugado 39a una proteína tetramérica tal como estreptavidina, el segundo agente de unión provisional es un anticuerpo anti-biotina. Como resultado, cuando la muestra contiene antígeno de VIH p24, en la línea de prueba, el antígeno de VIH p24 se retendrá en la línea de prueba por el anticuerpo AcM-2 p24 de la línea de prueba, y el conjugado marcador se unirá al primer conjugado porque el anticuerpo de biotina se unirá a la biotina que es parte del primer conjugado tal como se ve la Figura 4B.

Asimismo, la realización de la Figura 4C es similar a las realizaciones de las Figuras 4A y 4B, excepto en que se utiliza una disposición doble de unión provisional. Más particularmente, el segundo material 32 absorbente se proporciona con una almohadilla 32c además de la almohadilla 32b. En una realización, la almohadilla 32b se proporciona con antígeno AcM-1 de VIH p24 conjugado con biotina 41 x con la biotina que actúa como primer agente de unión provisional de un primer par, y una almohadilla 32c se proporciona con partículas tales como partículas de látex blanco conjugadas con estreptavidina y un antígeno secundario tal como FITC-A2 (isotiocianato de fluoresceína) 41 y. La estreptavidina de las partículas 41y actúan como segundo agente de unión provisional de un primer par, y el FITC-A2 actúa como primer agente de unión provisional de un segundo par. La almohadilla 31b se proporciona con conjugado 39z que tiene un marcador con el que se conjuga un anticuerpo anti-FITC que actúa como segundo agente de unión provisional de un segundo par. Con la disposición proporcionada, si la muestra contiene un antígeno p24, cuando la muestra se añade al segundo material 32 absorbente, el antígeno p24 se fijará al anticuerpo AcM-1 de VIH p24 con biotina en la almohadilla 32b. A medida que la muestra avanza a lo largo de su trayectoria de migración hacia la almohadilla 32c, la biotina se unirá a la estreptavidina del conjugado 41y; es decir, los primeros y segundos agentes de unión provisional del primer par se unen juntos, y el complejo del antígeno p24-anticuerpo AcM-1 de VIH p24 con biotina-estreptavidina/látex blanco/conjugado 41y de antígeno FITC se moverá hacia el sitio de prueba que incluye el anticuerpo AcM-2 de VIH p24. En el sitio de prueba, el antígeno p24 de la muestra se unirá al anticuerpo AcM-2 de VIH p24 en el sitio de prueba, y el complejo entero descrito previamente se mantendrá en el sitio de prueba. Cuando el tampón se añade a continuación a la primera trayectoria de migración y el conjugado marcador del anticuerpo anti-FITC se mueve hacia el sitio de prueba, el anticuerpo anti-FITC se unirá al FITC-A2 que se mantiene en el sitio de prueba; es decir, los primeros y segundos agentes de unión provisional del segundo par se unen juntos. Como resultado, el marcador se mantendrá en la línea de prueba y proporcionará un resultado positivo de la prueba.

Las realizaciones de las Figuras 4A-4C se pueden utilizar todas en conjunción con una muestra que se proporciona directamente en el aparato o con una muestra tal como la muestra descrita previamente contenida en el tubo 109d que es el resultado de una muestra que se ha mezclado previamente con un conjugado de reducción para antígenos o anticuerpos diferentes, pero emparentados con el antígeno o anticuerpo de interés y se ha filtrado a continuación. En todos los casos, las moléculas y conjugados sobre las almohadillas 32b y 31b y 32c (si están presentes) se seleccionan de manera apropiada, como lo son las moléculas sobre la línea 50 de prueba y el conjugado 104 de reducción liofilizado.

En la presente memoria, se han descrito e ilustrado varias realizaciones de inmunoensayos y métodos para su uso. Aunque se han descrito realizaciones particulares, no se pretende que las reivindicaciones estén limitadas por las mismas, ya que se pretende que las reivindicaciones sean tan amplias en alcance como permita la técnica y que la especificación se lea de la misma manera. Por consiguiente, aunque la especificación discute la unión de ligandos utilizando reacciones antígeno/anticuerpo, otros mecanismos de unión de ligandos tales como unión de aptámeros, unión de ácidos nucleicos, unión enzimática, etc. también se pueden utilizar. También, aunque las cubetas de prueba se describen como que tienen una única línea para someter a prueba un único ligando, se apreciará que se pueden utilizar dos o más líneas para someter a prueba a más de un ligando. Además, aunque las cubetas de prueba se describen como que tienen orificios en la pared superior de una carcasa para recibir la muestra y el subsistema tampón-disolución o tampón-conjugado, se apreciará que uno o ambos orificios se pueden proporcionar en la pared de extremo o pared lateral de la carcasa. De manera similar, aunque el material absorbente se describió como que incluye preferiblemente un refuerzo de plástico delgado, se apreciará que el refuerzo de plástico se podría proporcionar solo en ciertas ubicaciones o no proporcionarse en absoluto. Cuando solo se proporcionan refuerzos parciales o ningún refuerzo, los sitios de prueba y control se pueden ubicar bien en un lado o en ambos lados del material absorbente. Además, aunque una tira de prueba y tira de control se muestran como que son rectangulares

en configuración (es decir, líneas), se apreciará que los sitios de prueba y control se pueden configurar de manera diferente tal como en círculos, cuadrados, óvalos, una línea discontinua, etc. De hecho, el sitio de prueba y el sitio de control se pueden configurar de manera diferente entre sí.

5 Los expertos en la técnica también apreciarán que la carcasa se puede modificar de maneras adicionales para incluir ventanas separadas para cada línea de prueba. También, aunque las realizaciones se describieron en conjunción con el uso de una disolución de tampón que se añade a la trayectoria de migración del conjugado y, opcionalmente, a la trayectoria de migración de la muestra, se apreciará que uno o más tampones se pueden elegir, según se desee, para añadirlos a las trayectorias de migración dependiendo de la prueba o pruebas que se van a llevar a cabo. Por consiguiente, los tampones tales como tampones fosfato o tampones de TRIS  
10 (tris(hidroximetil)aminometano) se utilizan con frecuencia. Sin embargo, las realizaciones pretenden abarcar el uso de cualquier diluyente incluido el agua. Además, el diluyente, si se necesita, se puede añadir y mezclar con la muestra antes de añadir la muestra al material absorbente o la muestra se puede depositar primero y el diluyente se puede añadir después de la misma. Asimismo, se puede utilizar cualquier diluyente capaz de provocar que el conjugado de la trayectoria de "no muestra" migre, y se puede mezclar previamente con el conjugado en un sistema  
15 de conjugado líquido, o proporcionar en la trayectoria de migración para el conjugado en un sistema de conjugado seco.

Los expertos en la técnica también apreciarán que, aunque las realizaciones se describieron con referencia particular a la detección de un anticuerpo de gripe o un antígeno de VIH p-24, el aparato y los métodos pueden ser útiles en la detección de otros anticuerpos o antígenos tanto humanos como animales. También, aunque las  
20 realizaciones se describieron con referencia particular al uso de sangre como muestra, se apreciará que cualquier otro líquido corporal o excreción o porciones de sangre se pueden utilizar que incluyen, pero no se limitan a, orina, heces, saliva, esputo, suero sanguíneo (plasma), etc. Por lo tanto, los expertos en la técnica apreciarán que se podrían realizar todavía otras modificaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo (10) de prueba para determinar la presencia de un primer ligando de un primer virus en una muestra líquida, que comprende:
- 5 a) una primera tira (30) absorbente que tiene una primera ubicación (24) para recibir una disolución y definir una primera trayectoria de migración;
- b) un conjugado marcador adaptado para moverse a lo largo de dicha primera trayectoria de migración y unirse a dicho primer ligando;
- c) una segunda tira (32) absorbente distinta de dicha primera tira absorbente y que tiene una segunda ubicación (26) para recibir la muestra líquida y definir una segunda trayectoria de migración;
- 10 d) moléculas de reducción ubicadas sobre o en dicha segunda trayectoria de migración, en donde dichas moléculas de reducción incluyen un elemento de unión a ligando inmovilizado adaptado para unirse específicamente a segundos ligandos de un segundo virus que son diferentes, pero están emparentados con dicho primer ligando, ya que de dicho segundo virus pertenece al mismo género de dicho primer virus y dicho segundo ligando presenta reactividad cruzada con dicho primer ligando;
- 15 e) un sitio (50) de prueba ubicado sobre o en al menos una de entre dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente, dicho sitio de prueba tiene un primer mecanismo de unión a ligando inmovilizado para dicho primer ligando; y
- f) dichas primeras y segundas tiras absorbentes se tocan entre sí en la ubicación del sitio de prueba, en donde dicha segunda ubicación se retira de dicho sitio de prueba, de modo que la muestra aplicada a dicha segunda ubicación requiere tiempo para migrar a dicho sitio de prueba y no humedece inmediatamente dicho sitio de prueba.
- 20 2. Un dispositivo de prueba según la reivindicación 1, que comprende además:
- una carcasa que define una primera abertura adyacente a dicha primera ubicación, una segunda abertura adyacente a dicha segunda ubicación y una ventana adyacente a dicho sitio de prueba a través de la cual dicho sitio de prueba es visible, y dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente están dispuestas en una configuración en "T".
- 25 3. Un dispositivo de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde:
- dicho mecanismo de unión a ligando de dicho sitio de prueba es un antígeno o anticuerpo para dicho primer ligando, y dicho conjugado marcador comprende un antígeno o anticuerpo para el primer ligando y un marcador acoplado al antígeno o anticuerpo, en donde dicho marcador es preferiblemente un marcador coloreado visible en el espectro visible.
- 30 4. Un dispositivo de prueba según cualquier reivindicación previa, en donde:
- dichas moléculas de reducción comprenden un conjugado que incluye un antígeno o anticuerpo para el segundo ligando y partículas que no son fácilmente visibles por el ojo humano contra un fondo de dicho sitio de prueba, tal como látex blanco.
- 35 5. Un dispositivo de prueba según cualquier reivindicación previa, en donde:
- dicha primera tira absorbente tiene un primer tamaño de poro y dicha segunda tira absorbente tiene un segundo tamaño de poro con dicho segundo tamaño de poro preferiblemente mayor que dicho primer tamaño de poro.
6. Un dispositivo de prueba según cualquier reivindicación previa, que comprende además:
- 40 disolución de tampón, en donde dicho conjugado marcador está dispuesto sobre o en dicha primera trayectoria de migración y dicha disolución de tampón está adaptada para transportar dicho conjugado marcador hacia dicho sitio de prueba.
7. Un dispositivo de prueba según cualquier reivindicación previa, en donde:
- dicha primera tira absorbente incluye una primera membrana y un primer refuerzo y dicha segunda tira absorbente incluye una segunda membrana y un segundo refuerzo, y dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente están dispuestas de modo que dicha primera membrana esté en contacto con dicha segunda membrana, y dicho dispositivo de prueba comprende además una primera tarjeta de refuerzo adhesiva que cubre o solapa dicha primera tira absorbente, y una segunda tarjeta de refuerzo adhesiva que cubre o solapa dicha segunda tira absorbente.
- 45 8. Un dispositivo de prueba según cualquier reivindicación previa, en donde:

dicho primer ligando es un primer anticuerpo de gripe, tal como un anticuerpo de gripe pandémica; y

dicho segundo ligando es un segundo anticuerpo de gripe diferente de dicho primer anticuerpo de gripe, tal como un anticuerpo de gripe no pandémica.

5 9. Un método para someter a prueba una muestra para la presencia de un primer ligando de un primer virus, que comprende:

10 a) obtener un dispositivo (10) de prueba que tiene una primera tira (30) absorbente que tiene una primera ubicación (24) para recibir una disolución y definir una primera trayectoria de migración, un conjugado marcador ubicado sobre o en dicha primera trayectoria de migración, dicho conjugado marcador adaptado para unirse específicamente a dicho primer ligando, una segunda tira (32) absorbente distinta de dicha primera tira absorbente y que tiene una  
15 segunda ubicación (26) para recibir la muestra líquida y definir una segunda trayectoria de migración, moléculas de reducción ubicadas sobre o en dicha segunda trayectoria de migración en donde dichas moléculas de reducción incluyen un elemento de unión a ligando inmovilizado adaptado para unirse a segundos ligandos de un segundo virus que son diferentes, pero están emparentados con dicho primer ligando, ya que de dicho segundo virus pertenece al mismo género de dicho primer virus y dicho segundo ligando presenta reactividad cruzada con dicho primer ligando, y un sitio (50) de prueba ubicado sobre o en al menos una de entre dicha primera tira absorbente y dicha segunda tira absorbente, dicho sitio de prueba tiene un primer mecanismo de unión a ligando inmovilizado para dicho primer ligando, y dichas primeras y segundas tiras absorbentes se tocan entre sí en la ubicación de la ubicación del sitio de prueba, en donde dicha segunda ubicación se retira de dicho sitio de prueba, de modo que la muestra aplicada a dicha segunda ubicación requiere tiempo para migrar a dicho sitio de prueba y no humedece  
20 inmediatamente dicho sitio de prueba;

b) aplicar la muestra a dicha segunda ubicación;

c) después de dicha aplicación de la muestra, aplicar una disolución a la primera ubicación para provocar que dicho conjugado marcador migre a lo largo de dicha primera trayectoria de migración; y

25 d) examinar dicho sitio de prueba para determinar una indicación de la presencia del primer ligando en la muestra o la ausencia del mismo.

10. Un método según la reivindicación 9, en donde:

dichas moléculas de reducción comprenden un conjugado que incluye un antígeno o anticuerpo para el segundo ligando y partículas que no son fácilmente visibles por el ojo humano contra un fondo de dicho sitio de prueba.

11. Un método según la reivindicación 9 o reivindicación 10, en donde:

30 dicho dispositivo de prueba tiene una carcasa que define una primera abertura adyacente a dicha primera ubicación, una segunda abertura adyacente a dicha segunda ubicación y una ventana adyacente a dicho sitio de prueba a través de la cual el sitio de prueba es visible;

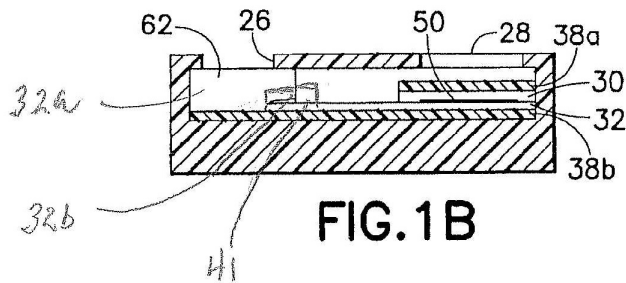
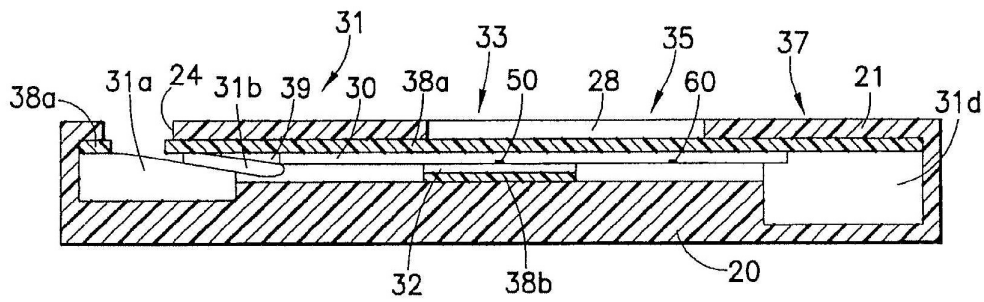
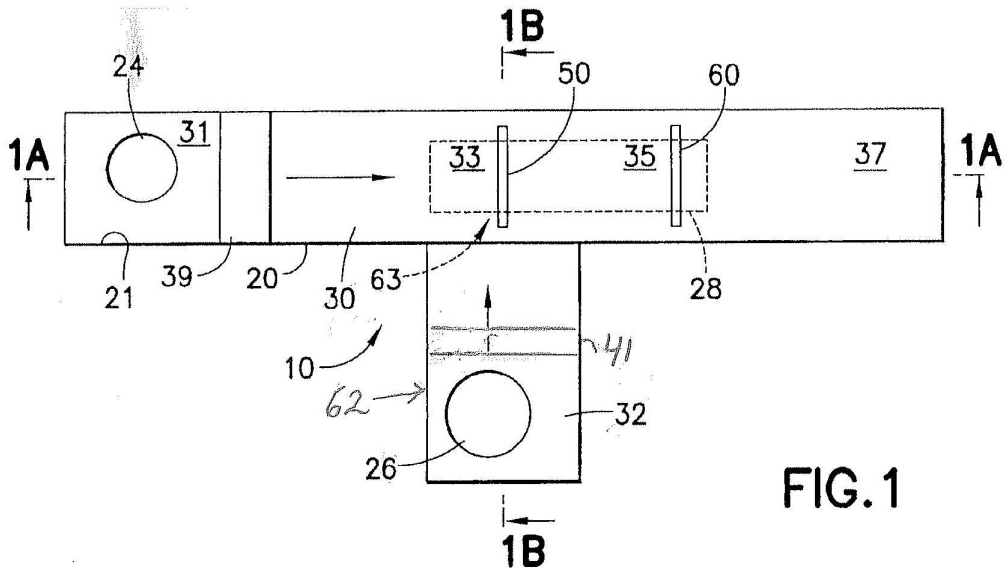
35 dicha aplicación de la muestra comprende depositar la muestra a través de dicha segunda abertura en dicha segunda ubicación, dicha aplicación de la disolución comprende depositar la disolución a través de dicha primera abertura en dicha primera ubicación; y

dicho examen comprende examinar a través de dicha ventana.

12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde:

dicho primer ligando es un primer anticuerpo de gripe, tal como un anticuerpo de gripe pandémica; y

40 dicho segundo ligando es un segundo anticuerpo de gripe diferente de dicho primer anticuerpo de gripe, tal como un anticuerpo de gripe no pandémica.



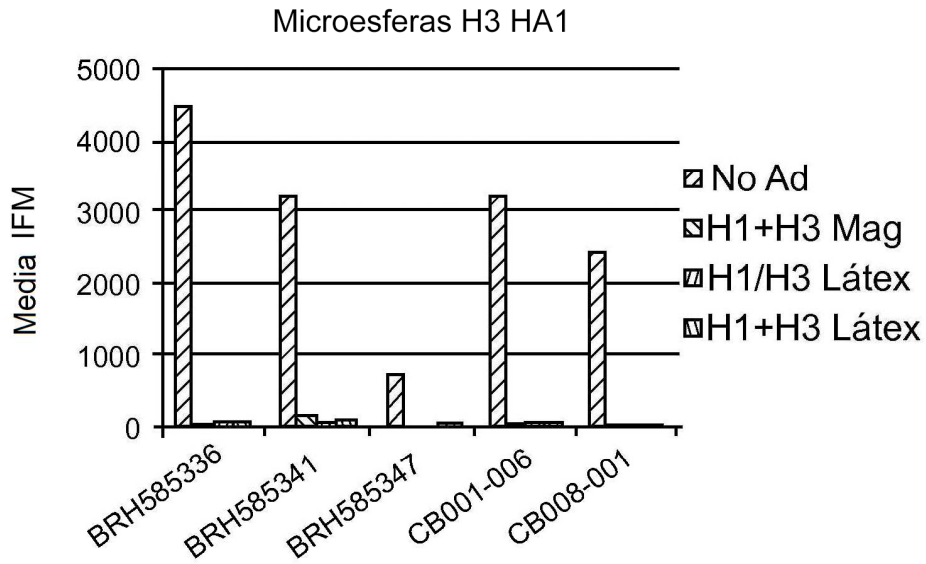


FIG. 2A

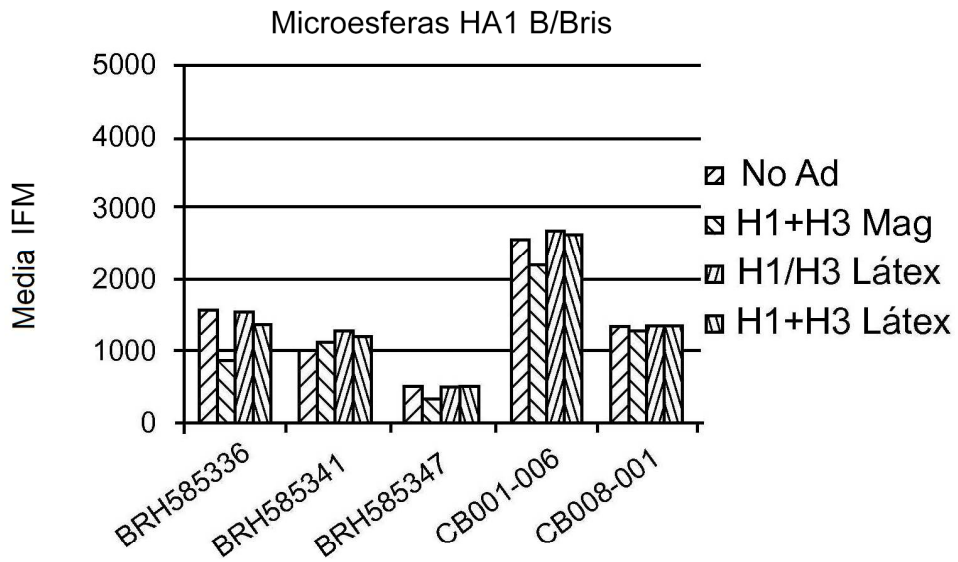


FIG. 2B



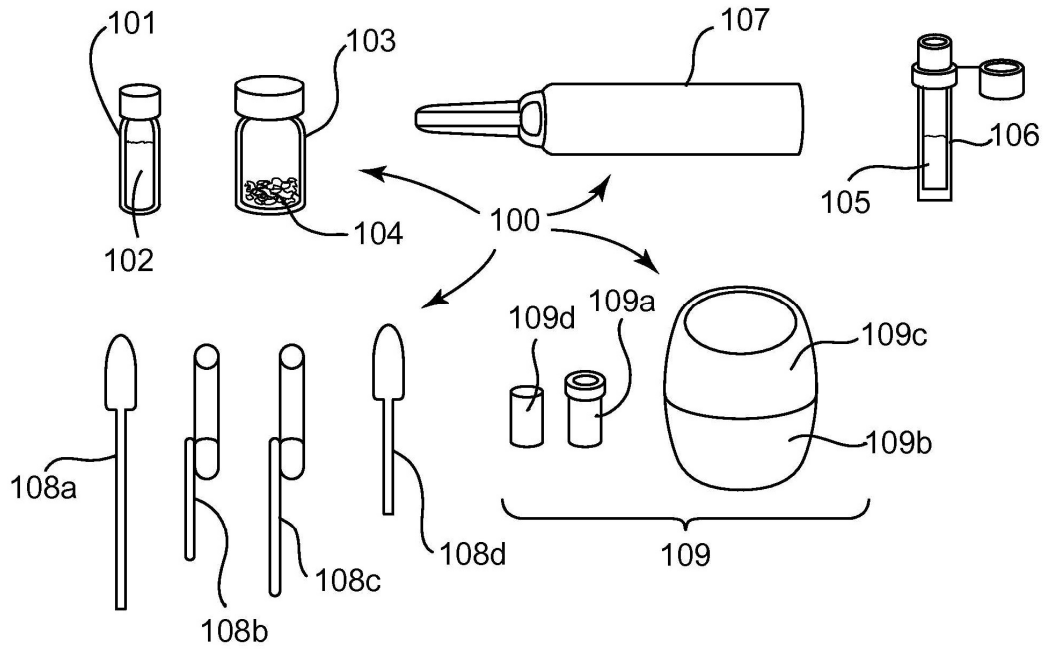


FIG. 3

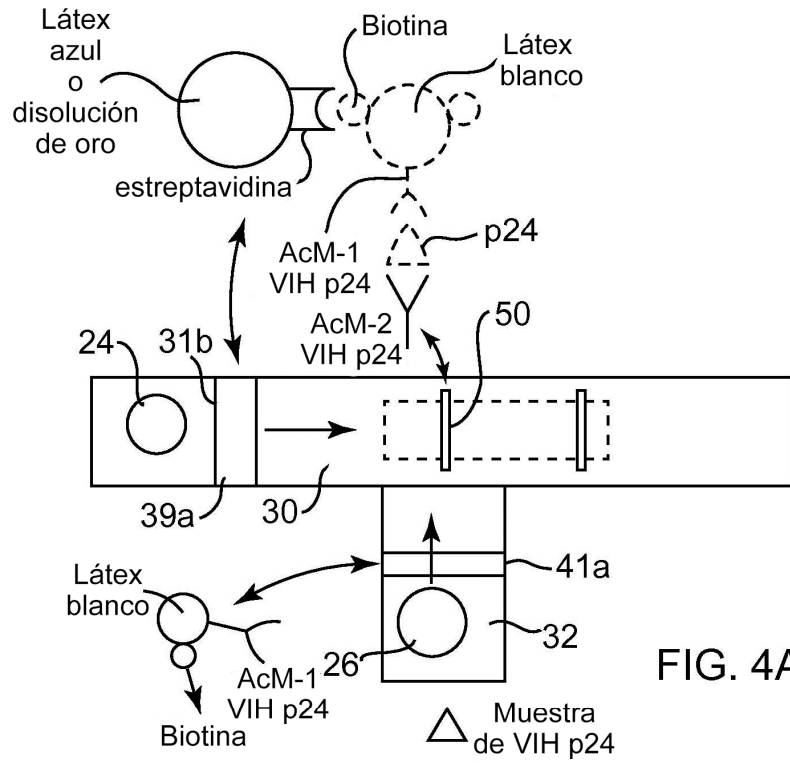


FIG. 4A

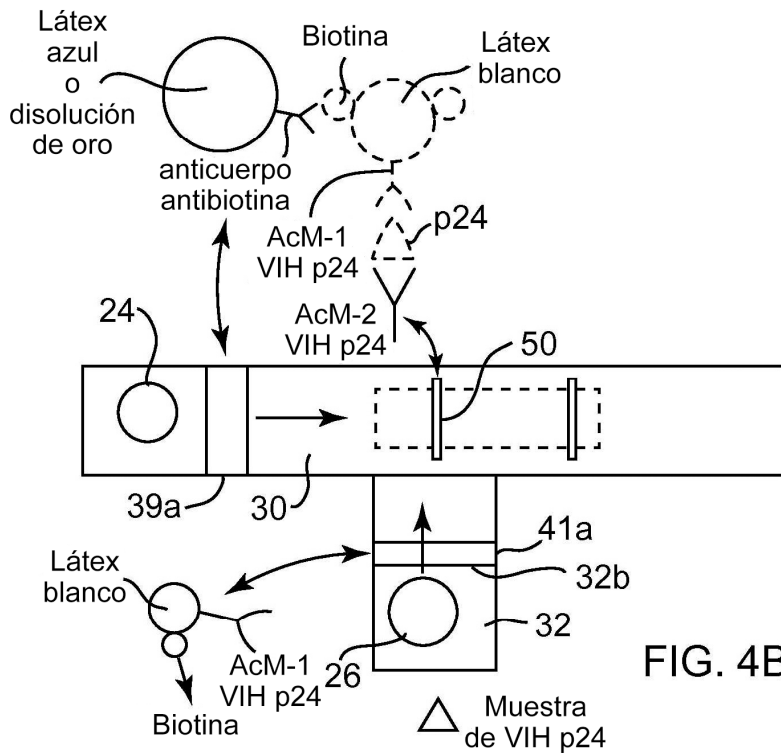


FIG. 4B

