

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 237**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2014 PCT/EP2014/053267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128184**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2014 E 14711165 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2959297**

54 Título: **Nuevo sistema de ensayo de PoC y procedimiento**

30 Prioridad:

**19.02.2013 EP 13155867**

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

**16.04.2020**

73 Titular/es:

**DST DIAGNOSTISCHE SYSTEME &  
TECHNOLOGIEN GMBH (100.0%)  
Güterbahnhofstr. 16  
19059 Schwerin, DE**

72 Inventor/es:

**DANGERS, MARC y  
RÜBENHAGEN, RENÉ**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 754 237 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**

Nuevo sistema de ensayo de PoC y procedimiento

5 La presente invención se refiere un sistema de ensayo o sistema de evaluación (sistema de detección) y a un procedimiento de ensayo de preferencia en uso para el sector de Point-of-Care (PoC).

10 En la investigación y el diagnóstico in vitro en humanos, veterinario, de alimentos o en una gran cantidad de otros campos de aplicación, los ensayos analíticos sirven para la determinación cualitativa o/y cuantitativa de moléculas, analitos o su actividad o composición. Los resultados de ensayo proporcionan diferentes declaraciones como, por ejemplo, parámetros diagnósticos para la identificación de enfermedades, procedencia de alimentos o eficacia de un medicamento.

15 Hoy en día, en los ensayos disponibles dominan los procedimientos conocidos de análisis mediante ADN y proteínas. Principalmente, las inmuno-evaluaciones representan procedimientos en los cuales se emplean anticuerpos para el enlazamiento específico de moléculas diana seleccionadas, suficientemente grandes, de casi cualquier tipo, por ejemplo, biomarcadores.

20 Los ensayos rápidos suministran valores de medición dentro de algunos minutos u horas después de comenzar el ensayo y cerca del sitio de la toma de muestras y sin necesidad de enviar lejos la muestra (Point-of-Care (PoC)).

25 Los procedimientos de ensayo estandarizados conocidos son el ensayo Lateral-Flow-Test (LFT), Flow-Through-Test (FTT), el ensayo de aglutinación (AT) o el ensayo Solid-Phase (SPT). Todos estos procedimientos detectan los analitos de modo directo y visual. Para tales ensayos existen adicionalmente dispositivos de lectura compactos que también proporcionan resultados cuantitativos.

30 Procedimiento de ensayo conocidos para el diagnóstico in vitro son los inmuno-ensayos (IA), principalmente inmuno-ensayos ligados a enzimas (EIA), o "binding assay" ("sandwich") (véanse, por ejemplo, las publicaciones EP0171150B1, EP 0063810B1). Además, refiérase a la publicación de Roger P. Ekins (por ejemplo, la publicación WO 8401031 y muchas otras).

35 Los ensayos de enlazamiento apoyados en membranas, principalmente de IgE de sangre sobre alérgenos son conocidos desde el final de los años 1980, por ejemplo, por CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 101, no. 25, del 17 de diciembre de 1984, página 578, abstract no. 228190b, Columbus, Ohio, US; B.J. WALSH et al.: "Allergen discs prepared from nitrocellulose: detection of IgE binding to soluble and insoluble allergens", & J. IMMUNOL. METHODS 1984, 73(1), 139-45. Algunos sistemas de ensayo basados en el principio de flujo lateral se encuentran disponibles comercialmente como ensayos rápidos de alergia.

40 Para el sector de PoC, el Fast-Check-PoC de la solicitante, el cual se encuentra disponible comercialmente, se describe a manera de ejemplo (véase la publicación EP1718970), el cual puede usarse con base en un ensayo de enlazamiento soportado en una membrana para la detección de alergias a partir de sangre entera.

45 Además, un ensayo rápido de la solicitante se describe en la publicación WO2011/000959, en la cual una membrana se humedece de manera dirigida entre los puntos de detección para introducir los reactivos de ensayo de manera particularmente efectiva y en paralelo a regiones específicas de la membrana cargada previamente con la sangre entera que va a analizarse.

50 Otro ensayo rápido de la solicitud se describe en la publicación WO2013026808A1 del 28.02.2013, en donde una membrana es lavada con un líquido por ambos lados. Para este propósito se fija la membrana en sus lados longitudinales sobre un dispositivo de modo que se crea un volumen libre en el lado superior e inferior de dicha membrana, a través de la cual los fluidos de volumen libre pueden fluir por la membrana. Asimismo, la publicación WO2006074350A2 divulga un sistema de ensayo genérico, aunque formando un U-turn (giro en U) sobre el soporte.

55 Sin embargo, existe una gran necesidad de ensayos rápidos mejorados. Principalmente, la carga uniforme de los sitios de detección individuales con fluido de muestra (analito) es capaz de mejorarse, como también un lavado eficiente de todos los sitios de detección y también un conducto de flujo reproducible de los fluidos que tolere las variaciones de las propiedades de membrana causadas por las tolerancias de fabricación. Todas estas propiedades, no obstante, son una condición previa para resultados reproducibles y de alta calidad.

60 Por lo tanto, es objeto de la presente invención es suministrar un sistema de ensayo en PoC, un procedimiento mejorado y mejor reproducible para cargar un soporte con un fluido de muestra para la detección de analitos por medio de moléculas receptoras.

65 Este objeto se logra de manera sorprendente por medio de la reivindicación 1. Según la invención, se proporciona un procedimiento de ensayo in vitro para la detección de al menos un analito de un fluido de muestra, en donde se usa un dispositivo que se compone de dos cámaras de muestra que se encuentran separadas por un soporte con al menos

dos superficies, en donde un lado frontal del soporte está enfrentado hacia la primera cámara de muestra y un lado posterior del soporte está enfrentado hacia la segunda cámara de muestra, y

5 a) al menos una molécula receptora se fija sobre el lado frontal de un soporte,

b) sobre el lado frontal y posterior del soporte se forma respectivamente al menos un volumen libre el cual está delimitado por una pared de cámara,

10 c) la primera cámara de muestra presentados aberturas, en donde a través de una primera abertura fluye un fluido de muestra a lo largo de un gradiente de flujo por el lado frontal del soporte hacia la segunda abertura distanciada del soporte,

15 d) la segunda cámara de muestra tiene al menos dos aberturas, en donde el fluido de muestra fluye a través de una primera abertura desde la primera cámara de muestra a lo largo de un gradiente de flujo por el lado posterior del soporte y en dirección opuesta al flujo sobre el borde frontal del soporte hacia la segunda abertura,

20 e) la segunda abertura de la primera cámara de muestra y la primera abertura de la segunda cámara de muestra están unidas entre sí por un canal, en cuyo caso este canal, en diámetro, es más pequeño que el diámetro de la cámara de muestra o del volumen libre y toda la corriente del líquido de muestra entre las dos cámaras de muestra pasa por el canal entre las cámaras de muestra,

f) la segunda abertura de la segunda cámara de muestra permite la descarga del fluido,

25 g) los volúmenes libres de b.) se forman al menos parcialmente con una columna de fluido,

h) en donde el gradiente de flujo a lo largo del lado frontal del lado posterior del soporte se efectúa por medio de aplicación de presión y arrastra la columna de fluido de g.), en cuyo caso la al menos una molécula receptora se enlaza con al menos un analito del líquido de muestra.

30 En lo sucesivo el "procedimiento según la invención".

35 El procedimiento según la invención permite de manera particularmente ventajosa la carga reproducible y lavado de un soporte con líquido de muestra para detectar analitos. Aquí se obtiene un mejoramiento cualitativo por la formación en el tiempo de una columna de fluido a lo largo de los gradientes de flujo sobre el soporte y los sitios de detección relevantes con las moléculas receptoras.

40 De acuerdo con la invención, el soporte separa las dos cámaras de muestra de modo que toda la corriente del líquido de muestra pasa entre las dos cámaras de muestra por el canal entre las cámaras de muestra, aunque de preferencia no más allá de los bordes del soporte. De esta manera se garantiza que incluso soportes con dimensiones variables se exponen a flujo del fluido de muestra en una medida comparable sobre el lado superior e inferior. Igualmente se prefiere que una curvatura cilíndrica cualquiera del soporte en la dirección transversal, que exista o se cree desde el principio o solamente después de mojar con el fluido de muestra, igualmente se reduce o incluso se liquida fijando el soporte entre las cámaras de muestra. Este aspecto según la invención también conduce a un flujo uniforme y reproducible deseado por el soporte.

45 Según la invención, un canal conduce desde la segunda abertura de una primera cámara de muestra a la primera abertura de la segunda cámara de muestra. Este canal hace posible por primera vez que las cámaras de muestra se separen con la ayuda del soporte y, no obstante, conduzcan la corriente del líquido desde la primera hacia la segunda cámara de muestra de modo que el lado frontal y el lado posterior del soporte puedan exponerse a flujo de la misma manera. Es sorprendente que el canal no influye el efecto de lavado, aunque actúa sobre el flujo de manera similar a una válvula reguladora.

50 Otra ventaja según la invención de esta forma de realización consiste en que mediante el canal se impide un reflujó del líquido de muestra en situaciones en las cuales se reduce la presión aplicada a las cámaras de muestra.

55 En una forma preferida de realización, este canal de la segunda abertura de una primera cámara de muestra hacia la primera abertura de la segunda cámara de muestra tiene un diámetro que corresponde aproximadamente al del suministro de la muestra y del canal para el residuo (waste). Además, este canal es más pequeño en diámetro que el diámetro de la cámara de muestra o del volumen libre. Además, se prefiere que el canal rodee un elemento de sujeción, principalmente un puntal transversal, del soporte y tenga una perforación redonda.

60 Gracias a estos aspectos se garantiza que, a pesar de las tolerancias de fabricación del soporte, de manera reproducible se crea un gradiente de flujo suficiente con respecto a las dos superficies del soporte, es decir el lado frontal y posterior, en cuyo caso un transporte de una fracción esencial, aunque al menos la mitad del líquido de prueba, puede lograrse ventajosamente por fuera del soporte. Esto es válido ante todo para ese sector del soporte que se alcanza o se humedece primero al hacer fluir hacia adentro el líquido de muestra y sobre el cual se encuentra,

en un sitio de detección, al menos una molécula receptora. Preferiblemente también se transportan otras soluciones, tal como una solución de lavado, esencialmente por fuera del soporte.

5 De acuerdo con la invención, la columna de líquido se forma a partir del lado frontal o posterior del soporte hacia la pared de la cámara opuesta de la respectiva cámara de muestra (techo de la cámara o base de la cámara).

10 En otra forma preferida de realización, la distancia de la primera o segunda superficie del soporte desde la pared de la cámara es de 10  $\mu\text{m}$  o más, en donde una columna de fluido se encuentra en el volumen libre sobre el lado frontal y/o el lado posterior tan pronto se origina el gradiente de flujo.

15 Sin embargo, se prefiere una distancia de 10 a 1500  $\mu\text{m}$  (1,5 mm) entre el lado frontal y posterior, respectivamente, y la pared de la cámara, en donde ventajosamente no puede efectuarse una interrupción del gradiente de flujo; se prefiere aún más una distancia de 80  $\mu\text{m}$  a 350  $\mu\text{m}$  y particularmente se prefiere una distancia de 120  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ .

20 Más aún, puede preferirse que ambas distancias de los lados frontal o posterior, respectivamente, del soporte sean diferentes y particularmente, a manera de ejemplo, se han de 170  $\mu\text{m}$  hasta el techo de la cámara (pared de la cámara, arriba) y, por ejemplo, de 150  $\mu\text{m}$  hacia la base de la cámara (pared de la cámara, abajo). La variación depende del gradiente de flujo deseado dependiendo del fluido de muestra.

25 Además, se prefiere que el soporte se corte longitudinalmente y se sujeten todos los sitios a la cámara de muestra. Se prefiere que los sitios longitudinales se sujeten entre dos bordes de los dos hemisferios que forman una cámara de muestra y el espacio libre o volumen libre por encima y por debajo de la membrana. También se prefiere que uno o ambos lados extremos del soporte se localicen en una guía forzada, por ejemplo, una cubre junta para evitar que se corra el soporte durante el montaje del casete de ensayo y para facilitar la fabricación. El soporte puede asimismo pegarse sobre los lados longitudinales o extremos. También es posible una combinación de sujeción por apriete y pegado. Otros procedimientos posibles para sujetar el soporte comprenden el moldeo de los bordes en una matriz polimérica, pegado con disolvente, soldadura ultra sónica y láser y térmica, soldadura de máscara de láser, fijación mecánica como, por ejemplo, apriete o remache (plástico), o tecnologías de impresión en 3D, en las cuales se logra una fijación del soporte por medio de moldeo.

30 En otra forma preferida de realización de la invención, el dispositivo de ensayo contiene, además de las dos cámaras de muestra, una tercera cámara que está unida de manera fluida con la segunda abertura de la segunda cámara de muestra, y en la cual se reúnen los líquidos adicionados (líquido de muestra, líquido de lavado, soluciones, etc.), Después de que han fluido por ambas cámaras de muestra. Esta tercera cámara (auxiliar) puede equiparse de una manera conocida con material absorbente, por ejemplo, algodón, celulosa, poliacrilatos o poliacrilatos funcionalizados (véase, por ejemplo, la figura 3). Se prefiere un volumen de cámara de al menos 1,0 ml, principalmente 5 - 10 ml.

35 En otra forma preferida de realización, la tercera cámara está unida por al menos una abertura o ventilación con el lado externo del casete de ensayo, de modo que puede realizarse una compensación de presión aplicando presión al casete de ensayo. Es particularmente ventajoso suministrar una cuarta cámara adicional entre la tercera cámara y el lado externo del casete de ensayo para que el fluido que sale de la tercera cámara, por ejemplo, resulta de llenar el casete de ensayo con volúmenes de fluido excesivos, o de un llenado excesivamente rápido, puedan recogerse en la cámara adicional y no pase hacia fuera, donde, por ejemplo, puede entrar en contacto con un usuario, lo cual es indeseable.

40 Por lo tanto, la invención también se refiere a una forma de realización en donde la descarga desde la segunda cámara de muestra ésta unida por un canal con otra cámara, en donde esta tercera cámara

45 a) contiene parcialmente un material absorbente y

50 b) contiene una ventilación que se forma preferiblemente como canal y de manera particularmente preferida como canal con al menos un doblez o al menos otra cámara.

55 La fuga del líquido de ensayo también puede impedirse por medio de membranas semipermeables adecuadas en la otra cámara, aunque esta forma de realización, no obstante, es mucho más compleja en términos de la fabricación.

60 En otra forma preferida de realización, la tercera cámara, el contenedor de residuos) se conecta por medio de un canal con la segunda cámara de la muestra. De esta manera se impide de manera efectiva una posible aspiración capilar por parte de los materiales en el contenedor de residuos.

65 Un procedimiento preferido para la fabricación del casete de ensayo es la soldadura por medio de un rayo láser de los componentes moldeados por inyección, con la cual puede lograrse una precisión suficiente de una manera reproducible. De manera sorprendente se ha encontrado que el más adecuado es un procedimiento en el cual se usan 3 capas de elementos estructurados, moldeados por inyección (el hemisferio superior, la parte media, el hemisferio inferior), entre cada uno de los cuales, antes de soldarse, se coloca una película provista parcialmente con boquetes o agujeros. La complejidad de fabricación parece inicialmente ser más grande como resultado de las dos películas y,

en consecuencia, el método parece ser inicialmente menos favorable. Sin embargo, de manera sorprendente, con este procedimiento pueden reducirse la complejidad y la precisión de las piezas moldeadas por inyección que puede lograrse. Particularmente se prefiere una forma de realización en la cual las películas están provistas de boquetes o cubrejuntas que facilitan la fijación del soporte antes de soltar, o de agujeros para permitir canales verticales.

5 Otro procedimiento para la preparación del casete de ensayo es la impresión 3D, la cual es adecuada particularmente para la fabricación de pequeñas cantidades de piezas.

10 En otra forma preferida de realización de la invención, el líquido de muestra no se aplica directamente al soporte, sino que se introduce en la cámara de muestra aplicando presión a través de un canal (de muestra) en el dispositivo de ensayo o es succionado por medio de presión negativa. En una forma preferida de realización, el canal (de muestra) se orienta en paralelo al soporte o en la dirección del gradiente de flujo que va a formarse. Por lo tanto, la invención también se refiere a un procedimiento en el cual el fluido de muestra se introduce en la cámara de muestra aplicando presión a través de un canal (de muestra) en el dispositivo de ensayo o es succionado hacia adentro por medio de presión negativa, en cuyo caso el canal de muestra desemboca en la primera abertura de la primera cámara de muestra (véase figura 3, por ejemplo), en donde un fluido de muestra fluye a través de esta primera abertura a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado frontal del soporte hacia la segunda abertura distanciada del soporte.

20 En una forma preferida de realización se encuentra un difusor a la entrada del primer volumen libre, como resultado de lo cual el fluido fluye mejor por el soporte en los bordes.

En otra forma preferida de realización, el soporte es sujetado a la pared de la cámara de manera que la curvatura presente u originada después de humedecer con un líquido muestra hacia el lado superior (véase figura 5).

25 Además, se prefiere el uso de volúmenes de muestra o volúmenes de solución que sean más grandes que el volumen de fluido que puede alojarse por el soporte o que sean más grandes que el volumen total del soporte en estado húmedo (véanse los ejemplos).

30 El gradiente de corriente puede generarse por medio de una aplicación de presión, en cuyo caso el fluido de muestra se expone a presión en la cámara de muestra. Una aplicación de presión adecuada puede generarse manualmente, principalmente por medio de una jeringa, ampolla o mecánicamente, principalmente por medio de una bomba o fuente.

Un gradiente de flujo adecuado ejemplar puede lograrse tal como sigue:

35 una suficiente aplicación de presión sobre la cámara es, por ejemplo, de 150 hPa, con un volumen de fluido de muestra típico de 95  $\mu$ l, si la altura de volumen libre es de 320  $\mu$ m, su anchura es de 3,5 mm, su longitud es de 50,5 mm y el tiempo de llenado buscado es de 5 s. A 10° del tiempo de llenado, es decir a 0,5 s, la presión necesaria es de aproximadamente 10 veces, es decir 1.500 hPa, en condiciones de otra manera iguales. Si la presión negativa se aplica a la abertura de salida, el tiempo de llenado es de al menos 0,75 s en condiciones de otra manera iguales.

40 Otra velocidad de flujo promedio preferida del fluido de muestra en la cámara es de 0,1 m/s, que puede lograrse confortablemente, por ejemplo, manualmente mediante una jeringa desechable de 1.000  $\mu$ l con 4 canales y corresponde a un período de llenado de 5 s (véase ejemplo).

45 Además, se prefiere que, por ejemplo, en el caso de un fluido de muestra con un volumen de 95  $\mu$ l, el volumen libre sobre el soporte tenga una longitud del soporte de 50 mm y una anchura de 3,5 mm, a una altura total de 320  $\mu$ m (de la base de la cámara al techo de la cámara), en donde la distancia desde la primera superficie al techo de la cámara es de 170  $\mu$ m y la distancia desde la segunda superficie a la base de la cámara es de 150  $\mu$ m.

50 La sobrepresión o la presión negativa máximas y la resistencia de flujo de la cámara de muestra han de calcularse asimismo en el caso de otras dimensiones de las cámaras de muestra y del soporte de manera que un fluido de muestra alcance la abertura de salida de acuerdo con el procedimiento según la invención en menos de 5 segundos, de preferencia en menos de 2 segundos.

55 Además, es ventajoso que el diámetro de la abertura de entrada en el caso de un volumen de fluido de prueba establecido de, por ejemplo, 95  $\mu$ l sea de 0,3 mm y el de la abertura de salida sea de 1,2 mm, en cuyo caso la distancia sobre el soporte a una velocidad de flujo dada es preferiblemente de 50,5 mm. Otras dimensiones pueden extrapolarse de manera correspondiente con base en las otras formas preferidas de realización.

60 Por lo tanto, la invención se refiere, en una forma preferida de realización, a una cámara de muestra optimizada en el caso de una entrada de fluido de muestra de 80-120  $\mu$ l, en donde la longitud del soporte es de 40 - 60 mm, la anchura del soporte es de 2,0 - 5 mm, y el diámetro de entrada es de 0,15 mm a 0,45, el diámetro de salida es de 1 mm a 1,5 mm, la altura total de la cámara de muestra es de 260  $\mu$ m a 450  $\mu$ m.

65 Según la invención, el gradiente de flujo es conducido en forma antiparalela sobre la primera y la segunda superficies del soporte (véanse las figuras 1a (para comparación) y 1 b).

Según la invención, el procedimiento de ensayo en el cual el flujo es conducido primero a lo largo del lado frontal del soporte, se conduce a través de otro canal desde el lado frontal del soporte hacia el lado posterior y, por consiguiente, en dirección contraria a otra abertura del segundo volumen libre (figura 1b). Aquí el flujo no se divide, sino que el flujo se guía a lo largo de ambos lados del soporte. Existe un pequeño riesgo de una falta de homogeneidad del flujo en la bifurcación. Además, en el caso de un volumen igual de las cámaras de muestra, la velocidad de flujo de la solución es dos veces más alta tal como en el ejemplo comparativo con flujo dirigido de manera igual. A volumen igual de fluido usado, adicionalmente se logra un efecto de lavado mejorado debido a la velocidad de flujo más alta. Es objeto de la divulgación proporcionar un procedimiento de ensayo para detectar al menos un analito de un fluido de muestra y dicho procedimiento consiste en proporcionar dos cámaras de muestra que de preferencia se separan por un soporte que es parcialmente permeable a fluido de muestra y que se compone de al menos dos superficies, en donde un lado frontal del soporte apunta hacia la primera cámara de muestra y un lado posterior del soporte apunta hacia la segunda cámara de muestra, y

a) se fija al menos una molécula receptora en el lado frontal de un soporte,

b) se forma al menos un volumen libre sobre el lado frontal del lado posterior del soporte, respectivamente, el cual está delimitado por una pared de cámara,

c) el fluido de muestra se divide en las cámaras de muestra por medio de una ramificación de canales en dos canales, en donde cada uno desemboca en una de las dos cámaras de muestra, en donde el fluido de muestra fluye respectivamente por una primera abertura a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado frontal y posterior del soporte a una segunda abertura distanciada del soporte,

d) las segundas aberturas de las cámaras de muestra pasan respectivamente al menos un canal, lo cual hace posible la descarga de las cámaras de muestra,

e) los volúmenes libres de b.) Se forman al menos parcialmente con una columna de fluido,

f) en cuyo caso el gradiente de flujo a lo largo del lado frontal y posterior del soporte se efectúa por medio de aplicación de presión y arrastra la columna de fluido desde e.).

En otra forma preferida de realización, pueden conectarse varias cámaras de muestra (por ejemplo, 1 a 10) en paralelo y pueden alimentarse desde un canal de muestra (véase figura 2).

Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento en donde a varias cámaras de muestra en paralelo se suministra un fluido de muestra desde un canal de muestra.

En el contexto de esta invención, el término "molécula receptora" significa sustancias tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, ligandos, receptores, anticuerpos o antígenos, ADN, ARN, APN, igualmente moléculas que no son de origen bioquímico tales como, por ejemplo, moléculas sintéticas. Los reactivos de ensayo pueden contener combinaciones de estos tipos de molécula o fragmentos de las mismas, conjugados de las mismas o formas modificadas de las mismas, por ejemplo, formas glicosiladas o fosforiladas. De acuerdo con la invención también se incluyen lípidos y azúcares. Además, en los reactivos de ensayo pueden estar presentes sustancias naturales y extractos naturales, tal como es el caso frecuentemente en los ensayos de alergia o ensayos de incompatibilidad de alimento. Al menos una molécula receptora se une al menos un analito del fluido de muestra. Por lo tanto, la invención también se refiere a ensayos de enlazamiento, en donde pueden obtenerse resultados particularmente reproducibles por medio del procedimiento según la invención.

En el sentido de esta invención, el soporte se compone de un material sólido que tiene una primera y una segunda superficie, total o parcialmente formada de una membrana de tipo gel, porosa, de tipo tamiz, permeable o semi-permeable, membrana de diálisis, principalmente una membrana recubierta o no recubierta. Los materiales ejemplares incluyen nitrocelulosa, PVDF, zeolita, materiales sinterizados, principalmente polióxido de etileno y materiales provistos posteriormente de micro-canales tales como silicio, vidrio o plásticos que hayan sido permeabilizados por medio de perforación con láser, bombardeo de iones o mediante grabado cáustico. El soporte puede estar recubierto, por ejemplo, con proteínas, principalmente anticuerpos, azúcares tales como dextranos, o con metales, vidrio o plásticos, o derivados de carbono como, por ejemplo, nanotubos de carbono.

"El soporte es permeable parcialmente para un fluido de muestra" significa que el fluido de muestra humedece al menos el soporte y el fluido de muestra se absorbe parcialmente al menos en el soporte. No se excluye la posibilidad de que una pequeña cantidad del fluido de muestra pase derecho. Por lo tanto, se prefieren membranas de acuerdo con la invención y se encuentran comercialmente disponibles.

El soporte en particular puede tener dos superficies planas-paralelas, las cuales de acuerdo con la invención forman un lado frontal y uno posterior. Principalmente, el soporte puede tener la forma de una membrana o de una viga plana. Los soportes pueden formar sitios de detección y pueden proveerse de moléculas receptoras (reactivos de ensayo).

Una o varias moléculas receptoras se fijan sobre la primera superficie de soporte. Además, al menos una molécula receptora puede fijarse sobre una segunda superficie de un soporte. Tal como se ha descrito, las moléculas receptoras también pueden fijarse en una capa por debajo de la primera o de la segunda superficie. Las moléculas receptoras pueden secarse, por ejemplo, sobre o cerca de la superficie, ya sea solas o en una matriz estabilizante, o pueden aplicarse como liofilizado y desprenderse de la superficie durante el humedecimiento. La fijación también puede proporcionarse usando interacciones no covalentes, tal como existen, por ejemplo, entre anticuerpos y proteína A, entre biotina y estreptavidina, entre hexahistidina y níquel-NTA, o durante el emparejamiento de bases de ADN. Además, un elemento de las moléculas receptoras puede enlazarse de modo covalente a la primera superficie. En una forma preferida de realización, durante el humedecimiento la molécula receptora permanece fijada esencialmente sobre la primera superficie, principalmente en más de 50 %.

Un fluido de muestra en el sentido de esta invención puede ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias, posiblemente. Con disolventes de cualquier origen, pero preferiblemente es un fluido biológico. El fluido de muestra puede provenir principalmente de una planta o de un animal, principalmente de un mamífero, principalmente de un ser humano. El fluido de muestra puede ser a manera de ejemplo y no ser concluyente: sangre entera, semi-sangre, suero, saliva, fluido de lágrimas, orina, secreción, fluido cerebral o formas tratadas de tales fluidos o pueden ser aquellos fluidos que contienen estos fluidos antes mencionados. El fluido de muestra también puede estar presente en forma diluida. El fluido de muestra contiene al menos un analito que está dirigido al menos una molécula receptora o causa una interacción detectable.

El fluido de muestra también puede contener reactivos tales como ligandos, competidores, anticuerpos, principalmente anticuerpos conjugados con digoxigenina, a los cuales pueden enlazarse hasta 100 anticuerpos anti-digoxigenina como anticuerpos secundarios y, por lo tanto, amplificar la señal; o anticuerpos etiquetados, enzimas o sustratos de enzimas, principalmente aquellos que causan un cambio de color o luminiscencia; y puede contener un segundo fluido orgánico de muestra que contienen, por ejemplo, otro anticuerpo y causa un cambio de color a otro color.

Aún más, el fluido de muestra puede contener estabilizantes o anticoagulantes tales como EDTA, heparina o citrato.

Otra solución también puede contener detergentes, moléculas de captura para enlazar sustancias libres que no se han enlazado a una molécula receptora, o inhibidores de enzimas tales que la solución sea adecuada para lavar o detener una reacción.

Una solución puede contener agua bidestilada, destilada o de acueducto, con o sin otras sustancias; y el agua puede haber pasado adicionalmente a través de un intercambiador iónico. Además de eso, la solución puede contener componentes convencionales de regulador de pH para estabilizar el valor de pH o para estabilizar componentes del fluido de muestra.

La cámara de muestra es una cavidad en la cual se localiza el soporte y contiene ambas aberturas (entrada, salida). La cámara de muestra puede tener una forma optimizada para manejo manual, por ejemplo, la forma de un rectángulo plano el cual puede ser sostenido en una mano. El rectángulo es preferiblemente de menos de 1 cm de grueso. Los fluidos pueden inyectarse en la cámara de muestra de manera sucesiva por medio de jeringas que se operan usando la otra mano. El lado superior de la cámara de muestra puede contener una cubierta transparente que libera la vista al menos de partes del soporte y hace posible una evaluación visual rápida del ensayo según el procedimiento de acuerdo con la invención. Además, la cámara de muestra puede ser diseñada de modo que pueda colocarse en un lector que contiene dispositivos para llenar la cámara de muestra o para hacer una lectura del ensayo. Los dispositivos de este tipo, principalmente en forma miniaturizada, pueden integrarse en otra carcasa o similares.

La presión con la cual el fluido de muestra fluye a través de una abertura en la cámara de muestra puede generarse preferentemente de manera manual por medio de una jeringa, en cuyo caso la jeringa tiene de preferencia un volumen que no es más pequeño que una décima y no es mayor que 10 veces el volumen de la cámara de muestra. Además, la jeringa tiene preferiblemente una conexión Luer. Usando una jeringa, los fluidos pueden aspirarse primero y luego inyectarse en la cámara de muestra.

La jeringa para generación de presión también puede operarse con una bomba de jeringa. En este caso es ventajoso que la presión pueda generarse de manera uniforme y de una manera reproducible. En esta forma de realización, un conector de manguera puede encontrarse ventajosamente entre la bomba de jeringa y la cámara de muestra, y el extremo por el lado del casete de dicho conector puede configurarse como una conexión de Luer. Además, puede ser preferible suministrar una válvula con al menos dos vías, de modo que los reactivos/el fluido de muestra puedan aspirarse desde uno o varios contenedores de almacenamiento y luego suministrarse en a la cámara de muestra.

La presión también puede generarse de otra manera manualmente o mecánicamente, por ejemplo, almacenando los reactivos/el fluido de muestra en un recipiente de almacenamiento compresible provisto de una abertura. La abertura puede proveerse ventajosamente de un adaptador de Luer. Ejerciendo presión manualmente sobre el dispositivo de almacenamiento, la solución de ensayo pasa del contenedor de almacenamiento a la cámara de muestra. La presión sobre el contenedor de almacenamiento también puede generarse por medio de una máquina, por ejemplo, un pistón,

una palanca o un dispositivo para apretar el recipiente de almacenamiento que, a su vez, puede accionarse de manera neumática o hidráulica por medio de un motor.

5 En todos los procedimientos y dispositivos, la aplicación de presión puede ocurrir como una sobrepresión a través de la abertura de entrada o como una presión negativa a través de la abertura de salida.

10 El contenedor de almacenamiento puede estar diseñado para uso de una sola vez en forma de fuelle o blíster de plástico o lámina, principalmente en forma pre-llenada y cerrada. Son ventajosos los fueles o blísters de plástico o de lámina, principalmente ampollas desechables. Puede preferirse integrar un blíster o una ampolla desechable en el casete de ensayo de modo que se fabriquen conjuntamente en la misma operación de manufactura y los contenedores de almacenamiento se encuentren prellenados en una segunda etapa.

15 En otra forma preferida de realización de la invención, se usa una bomba que bombea la soluciones/fluidos de muestra y los introduce en el espacio de muestra. La bomba puede encontrarse entre contenedor de almacenamiento y el espacio de muestra y puede bombear las soluciones/fluidos de muestra directamente, o puede bombear aire o un fluido en el contenedor de almacenamiento provisto de dos aberturas de modo que el fluido localizado allí se desplaza y se bombea a la cámara de muestra. Además, pueden preverse que se use una bomba que puede bombear hacia delante y hacia atrás y usar una válvula con al menos dos días de modo que los reactivos de ensayo puedan bombearse hacia fuera desde uno o varios contenedores de almacenamiento y luego alimentarse a la cámara de muestra. La bomba puede encontrarse también después de la cámara de muestra y puede generar presión negativa en la cámara de muestra de modo que se succionen fluidos a la cámara de muestra desde un contenedor de almacenamiento compresible localizado antes de la cámara de muestra mediante presión negativa y se succionen opcionalmente más allá hacia el contenedor de residuo. En esta forma de realización es de ventaja particular que la bomba no se contamina con ninguno de las soluciones/fluidos de muestra y, por lo tanto, puede continuar usándose sin limpiar. Son particularmente adecuadas las microbombas tales como, por ejemplo, O-run 100 o O-run 200 de PARIttec GmbH, Gräfelting, Alemania. Además, son particularmente adecuadas las bombas de membrana y las bombas de micromembrana, las bombas de manguera y las bombas de anillos dentados (engranajes).

30 Un fluido, que puede ser un fluido de muestra o una solución, fluye a la cámara de muestra con un componente de flujo paralelo a la primera y a la segunda superficie del soporte. Si un analito que puede enlazarse con al menos una molécula receptora se localiza en el fluido, este se habilita tan pronto como el fluido se pone en contacto con la molécula receptora. Aquí puede ser preferible que, después de la introducción de los fluidos, se alivie la presión a aproximadamente la presión atmosférica, de modo que los fluidos se localizan sobre el soporte, no continúan fluyendo o continúan fluyendo difícilmente y pueden incubarse y enlazar la molécula receptora y el analito sin tener que adicionar un nuevo fluido. Además, puede ser preferido revertir la proporción de presión durante algún tiempo de modo que el fluido se mueva en dirección inversa o alternar las condiciones de presión durante algún tiempo de modo que el fluido se mueva adelante y atrás sobre el soporte. En comparación con un fluido inmóvil, es posible entonces un mejor intercambio de sustancia entre el fluido y el soporte sin la necesidad de más fluido.

40 Otro fluido/solución puede usarse para lavar el soporte. Al lavar, también puede ser preferible permitir que el fluido permanezca sin moverse o que se mueva sólo ligeramente sobre el soporte durante algún tiempo para usar pequeñas cantidades de fluido. Igualmente, al lavar puede aplicarse la presión de manera alterna.

45 Es sorprendente que un protocolo de ensayo, tal como se describe en el ejemplo 1, pueda suministrar resultados que pueden leerse a simple vista similarmente bien como, por ejemplo, en los ensayos de Lateral Flow conocidos por el estado de la técnica. Sin embargo, en el caso de un ensayo de Lateral Flow los fluidos fluyen por fuerzas capilares a través del soporte y en paralelo a las superficies del mismo y, en consecuencia, alrededor de las moléculas receptoras o incluso a través de los campos de ensayo/detección.

50 Una ventaja del procedimiento según la invención también es que no sufren por diafonía, lo cual puede ocurrir en el caso de un ensayo de Lateral Flow cuando dos moléculas receptoras localizadas en diferentes campos de ensayo se enlazan al mismo analito.

55 En el caso del procedimiento según la invención, el fluido fluye sobre el soporte de manera suficientemente rápida de modo que, al hacer contacto con el primer reactivo de ensayo no hay agotamiento del analito que falsifique el valor de fluido y no hay influencia en la interacción con una segunda molécula receptora.

60 Otra ventaja del procedimiento según la invención consiste en que pueden adicionarse varios fluidos de manera sucesiva, sencilla, con cualquier intervalo de tiempo y casi sin mezclar. En el caso de un ensayo de Lateral Flow existe la posibilidad, por el contrario, exclusivamente con limitaciones, ya que el fluido sólo se mueve desventajosamente por medio de un efecto capilar de la tira de ensayo o de la wick pad (almohadilla de mecha). Una vez aplicado, un fluido se mueve continuamente en la dirección del soporte o de la almohadilla de mecha que aún no se han humedecido. También es característico para el efecto capilar que los fluidos aplicados a soporte al mismo tiempo o sucesivamente se topen uno con otro y se mezclen conjuntamente. A causa de esto, los métodos de ensayo enzimáticos muy sensibles, en los cuales ocurren una amplificación de señal deseada, por ejemplo, por medio de peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina, pueden llevarse a cabo sólo de manera limitada, por ejemplo, mediante secado. En

realidad, los ensayos de Lateral Flow ofrecidos comercialmente se basan exclusivamente en protocolo de ensayo en los cuales no ocurre una etapa enzimática y los cuales no se adiciona más de un reactivo líquido a la muestra.

También existen ventajas en comparación con ensayos realizados de manera abierta, en los cuales las soluciones de ensayo se localizan en el sobrenadante sobre una membrana. En estos ensayos, una membrana libre o una membrana fijada en un marco se sacude manualmente en una tina, tal como es el caso en la publicación EP1718970 de la solicitante, o la tina se mueve continuamente usando un agitador mecánico o un agitador de tambaleo. Por medio de la agitación, se induce un movimiento del sobrenadante con respecto a la membrana y, en consecuencia, se obtiene un intercambio de sustancias mejorado para la reacción de enlazamiento, y también para la reacción de lavado, lo cual conduce a resultados similarmente buenos como el procedimiento según la invención. Las ventajas de la estructura cerrada, no obstante, residen en evitar contaminaciones de la muestra, proteger al usuario contra salpicaduras y contacto con el fluido de muestra y en la independencia de parámetros de operación tales como la frecuencia de agitación del agitador. Por lo tanto, la reproducibilidad se mejora por medio de los procedimientos según la invención.

También es sorprendente que los resultados sean mucho mejores cuando ambas superficies del soporte entran en contacto con los fluidos. Esto es sorprendente puesto que la segunda superficie en ambos casos se pone en contacto con flujos, cantidades de sustancia y concentraciones del fluido de ensayo, reactivos y fluidos de lavado proporcionalmente similares. En una comparación experimental, no obstante, se observa un efecto de lavado mucho peor si el segundo lado o el lado posterior del soporte se asegura en el fondo del espacio hueco.

Una lectura del resultado de ensayo puede efectuarse gracias a que el casete de ensayo presenta una cubierta transparente a través de la cual pueden observarse los reactivos de ensayo y el valor de color o los cambios de escala de grises puede leerse visualmente. Esta disposición también permite una lectura foto métrica del procedimiento de ensayo, principalmente con el uso de un sistema óptico el cual refleja los resultados de ensayo sobre un sensor de imagen. Este sensor de imagen es preferiblemente un sensor CCD o CMOS. Particularmente económicos y, no obstante, eficientes son los sistemas ópticos del campo del consumidor, tal como se usan en cámaras, cámaras web y teléfonos móviles. En el caso de un ensayo con cambio de color o cambio de fluorescencia, puede ser preferible usar un filtro de color o un sensor de color con fotos sensores sensibles al color. Al usar fluorescencia, la fluorescencia puede excitarse usando una lámpara, un láser o un LED.

En otra forma de realización, se usan procedimientos de detección electro químicos para la lectura, tal como se han desarrollado en los últimos años generalmente para procedimientos diagnósticos; por ejemplo, Dionex ED 40 Electrical Detector User Manual, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4529-34855-03.pdf>, Gau, V. et al "Oral Fluid Nanosensor Test (OFNASET) with Advanced Electrochemical-Based Molecular Analysis Platform", Ann. N.Y. Acad. Sci. 1098: 401-410 (2007) doi: 10.1196/annals.1384.005. Wood, M. et al. "eSensor®: An Electrochemical Detection Based DNA Microarray Technology for Multiplexed Molecular Diagnostics" Abstracts of the 219th meeting of the Electrochemical Society (ECS) mayo 1, 2011 - mayo 6, 2011, Montreal, QC, Canadá.

Asimismo se divulga el uso de un kit que se compone de un sistema de ensayo con dos cámaras de muestra que se encuentran separados por un soporte con al menos dos superficies, que se compone de una cámara de muestra que contiene un soporte junto con moléculas receptoras para la realización de un ensayo de enlazamiento, con una entrada y una salida, en cuyo caso existe un espacio libre al techo de la cámara y a la base de la cámara y, opcionalmente, otra cámara auxiliar que se encuentra conectada de manera fluida con la cámara de muestra, conjuntamente con un medio para aplicación de presión y otros auxiliares de aditivos tales como una solución de detención, solución de lavado, etc. Otras formas de realización pueden suministrarse de manera correspondiente tal como en el sistema/procedimiento de ensayo anterior. Principalmente, la invención se refiere, por lo tanto, a tipo genérico para la detección de al menos un analito de un fluido de muestra, que comprende dos cámaras de muestra, que están separadas por un soporte con al menos dos superficies, en cuyo caso un lado frontal del soporte apunta a la primera cámara de muestra, y un lado posterior del soporte apunta a la segunda cámara de muestra, y

a) al menos una molécula receptora está fijada sobre el lado frontal de un soporte,

b) al menos un volumen libre se forma sobre el lado frontal del lado posterior, respectivamente, del soporte y está delimitado en cada caso por una pared de cámara,

c) la primera cámara de muestra tiene al menos dos aberturas, en donde un fluido de muestra fluye a través de una primera abertura a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado frontal del soporte hacia la segunda abertura distanciada del soporte,

d) la segunda cámara de muestra tiene al menos dos aberturas, en donde el fluido de muestra fluye a través de una primera abertura desde la primera cámara de muestra a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado posterior del soporte y en dirección opuesta al flujo sobre el lado frontal del soporte hacia la segunda abertura,

e) la segunda abertura de la primera cámara de muestra y la primera abertura de la segunda cámara de muestra se interconectan por medio de un canal, en cuyo caso este canal es más pequeño en diámetro que el diámetro de las

cámaras de muestra o del volumen libre, y todo el flujo de fluido de muestra entre las dos cámaras de muestra pasa por el canal entre las cámaras de muestra,

f) la segunda abertura de la segunda cámara de muestra hace posible la descarga del fluido,

g) los volúmenes libres de b.) se forman al menos parcialmente con una columna de fluido,

h) en cuyo caso el gradiente de flujo a lo largo del lado frontal y posterior del soporte se provee de medios de aplicación de presión y arrastra la columna de fluido de g.), en cuyo caso la al menos una molécula receptora se enlaza al menos con un analito del fluido de muestra.

La divulgación se refiere principalmente, por lo tanto, a kits genérico para la detección de al menos un analito de un fluido de muestra que comprende dos cámaras de muestra que están separadas por un soporte con al menos dos superficies, en donde un lado frontal del soporte apunta hacia la primera cámara de muestra y un lado posterior del soporte apunta hacia la segunda cámara de muestra, y

a) al menos una molécula receptora está fijada sobre el lado frontal de un soporte,

b) al menos un volumen libre se forma sobre cada uno de los lados frontal y posterior del soporte y está delimitado en cada caso por una pared de cámara,

c) el fluido de muestra se divide en las cámaras de muestra a través de un canal que se ramifica en dos canales, en cuyo caso cada uno desemboca a una de las dos cámaras de muestra, en donde el fluido de muestra fluye en cada caso a través de una primera abertura a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado frontal y posterior del soporte respectivamente hacia una segunda abertura distanciada del soporte,

d) la segunda abertura respectivamente de las cámaras de muestra pasa al menos un canal que hace posible la descarga de las cámaras de muestra,

e) los volúmenes libres de b.) se forman al menos parcialmente con una columna de fluido,

f) en cuyo caso el gradiente de flujo a lo largo del lado frontal y posterior del soporte se efectúa por medio de aplicación de presión y arrastra la columna de fluido de e.).

Otro objeto de la invención se refiere al uso del procedimiento según la invención o de un kit para la detección de al menos un analito (sustancia) de un fluido de muestra en el diagnóstico humano, médico veterinario o vegetal, el diagnóstico de alimentos, diagnóstico ambiental, diagnóstico forense, farmacología, toxicología, en alergias, enfermedades autoinmunes o metabólicas, enfermedades infecciosas, enfermedades transmitidas sexualmente, intolerancias a alimentos, enfermedades parasitarias, determinación de pequeñas moléculas tales como drogas, medicamentos o productos del metabolismo, mediadores de células, tipificación de tejido, tipificación de tipos, tipificación de alimentos, tipificación de antígenos, tipificación de epítomos y detección de ADN o ARN.

Particularmente se prefiere el empleo del procedimiento según la invención o de un sistema de ensayo (dispositivo) en el sector de Point-of-Care.

### **Ejemplos y figuras:**

Estos ejemplos sirven exclusivamente para explicar la invención y no limitan la invención a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Protocolo de ensayo para ensayo de alergia

#### **Preparación**

Llevar la caja de ensayo con tubitos y casete de ensayo (kits que contiene cámara de muestra) y también la muestra del paciente a temperatura ambiente (18-25°C).

Tener listos el cronómetro, los guantes desechables, el contenedor para residuos sólidos y bolígrafo.

Retirar el casete de ensayo y la jeringa.

Todas las incubaciones se efectúan a temperatura ambiente.

Transponer verticalmente los tubos de reactivo insertados en la caja de ensayo (kit), ya sea previamente al, o a continuación del, procedimiento de ensayo en los dispositivos de sujeción marcados con color de manera correspondiente en el borde superior de la caja.

1.1. Introducción de la muestra:

5 Abrir tubos de muestra (tapa roja) que contienen la muestra previamente introducida y transferir contenido completamente libre de burbujas al casete de ensayo por medio de la jeringa. Para este propósito insertar la jeringa en la abertura de la muestra e inyectar el contenido rápidamente.

Depositar el casete de ensayo sobre un soporte plano e incubar durante 4 minutos.

10 1.2. Creación de la solución de ensayo:

Tal como se ha descrito antes (sección 10.1.) inyectar rápidamente el contenido de la solución de conjugado (tapa amarilla) con ayuda de la jeringa en la entrada del casete de ensayo e incubar esta, depositada, durante 8 minutos.

15 1.3. Lavado:

Abrir el primer tubo de ensayo que contiene solución de lavado (tapa azul) e inyectar rápidamente contenido como se ha descrito previamente a la entrada del casete de ensayo. Luego, inmediatamente, inyectar rápidamente el contenido del segundo tubo de ensayo que contiene solución de lavado (tapa azul). No se requiere incubación.

20 1.4. Desarrollo:

25 Abrir el primer tubo que contiene sustrato de color (tapa blanca) e inyectar rápidamente contenido en la entrada del casete de ensayo. Luego, abrir inmediatamente el segundo tubo de ensayo que contiene sustrato de color (tapa blanca), inyectar el contenido sin burbujas en la entrada del casete de ensayo e incubar este, depositado, durante 8 minutos.

Durante el desarrollo, en cada campo de ensayo se vuelven visibles 2 líneas de referencia paralelas de diferente intensidad y posiblemente, de manera adicional, una línea de ensayo central.

30 1.5. Detención:

35 Abrir los tubos de ensayo que contienen solución de detención (tapa verde) e inyectar el contenido en la entrada del casete de ensayo. Nota: los resultados de ensayo son estables durante al menos 12 horas y pueden leerse durante este tiempo.

Ejemplo 2: Cámara de ensayo (cámara de muestra)

40 En lo sucesivo se indican las dimensiones para la membrana y los valores de las distancias de la misma desde otros elementos del dispositivo. Aquí debe notarse que todas las dimensiones/valores se especifican para el estado seco de la membrana y que no se toman en consideración una posible deflexión de la membrana o asperezas superficiales o una eventual combadura de la pieza moldeada por inyección. En estado húmedo la membrana puede hincharse o doblarse y, por lo tanto, puede tener un grosor modificado y distancias modificadas hacia otros componentes.

45 Una membrana de nitrocelulosa (reforzada) de 140 µm de grosor se corta a una medida de 50,5 mm \* 6,3 mm. La tira de membrana resultante se coloca sobre una película provista de una cavidad, de manera que la tira cubre completamente la cavidad se sujeta apretándose a sus lados extremos respectivamente por debajo de un cubrejuntas y dicho cubrejuntas se localiza en los extremos del lado extremo de la cavidad en la película. La película se sujeta apretándose con la tira de membrana entre dos hemisferios moldeados por inyección que, junto con la película de la membrana, forman ambas cámaras de muestra de acuerdo con las figuras 1b y 2, cuya anchura es de 3,5 mm. El volumen total de la membrana es, por lo tanto, de 44,5 µl, y el de la membrana libre es de 24,7 µl. La distancia del lado superior de la membrana hacia el lado interno esencialmente plano de la pared de la cámara es de 170 µm y aquella del lado inferior de la membrana hacia la pared de la cámara inferior esencialmente plana del hemisferio es de 150 µm. El volumen de la cámara superior es de 30,04 µl, y aquel de la cámara inferior es de 26,51 µl. La sección transversal de la parte no sujeta de la membrana es de 0,49 mm<sup>2</sup>, la de la cámara es de 1,62 mm<sup>2</sup>.

55 La cámara está provista de una abertura de entrada en la primera cámara de muestra en la vecindad de un extremo de la membrana; dicha abertura de entrada tiene una sección transversal de 0,3 mm<sup>2</sup>, y de una abertura de salida en la segunda cámara de muestra en la vecindad de la membrana con una sección transversal de 1,2 mm<sup>2</sup>.

60 En el dispositivo de ensayo se ejecutan 4\*2 cámaras en paralelo de modo que el volumen total de membrana es de 98,98 µl, el de las primeras cámaras sin flujo de entrada y de salida es de 120,19 µl y el de las segundas cámaras es de 106,05 µm. Éstas se llenan simultáneamente por medio de un acceso individual (canal de muestra), el cual se disemina in 4 canales, cada uno de los cuales se conecta a una primera cámara. Las aberturas de salida a su vez convergen en un solo canal que se conecta con un volumen de residuo integrado en el dispositivo de ensayo en el cual se acomoda el material absorbente de volumen de residuo. El material absorbente no se conecta de manera no fluida con una membrana de modo que el efecto de succión es limitado al fluido libre que llega hasta el residuo. El

dispositivo de ensayo presenta ventanas a través de las cuales pueden observarse las regiones de las tiras de ensayo cargadas con reactivo.

5 Una película opaca provista de cavidades se pega al casete de ensayo. Las cavidades sirven como ventanas a través de cada una de las cuales pueden verse o leerse los campos de medición, cada uno contemplado para un alergénico respectivo usando un lector óptico. Las conexiones entre las ventanas que se alinean a lo largo de un soporte se mantienen tan estrechas como sea posible, por ejemplo, de 2 mm o menos. Las conexiones perpendiculares a estas, de soporte a soporte son más anchas de modo que hay suficiente espacio en ellos para informaciones impresas con respecto a los campos de medición individuales. Esta información puede incluir números, abreviaturas o todo un término, por ejemplo, que designa el alergénico.

10 En un ensayo se adicionan las siguientes sustancias y cantidades en el dispositivo de ensayo de acuerdo con el protocolo 1:

1) Muestra incluido diluidor de muestra	380 µl
2) Tampón de lavado según operación	1.000 µl
3) Solución de sustrato según operación (lavar 2 veces)	2* 800 µl
4) Anticuerpo / solución de conjugado 1	800 µl
5) Anticuerpo / solución de conjugado 2	800 µl

15 El volumen de cada componente de ensayo individual es más grande que el volumen de las membranas (100 µl).

Descripción de las figuras:

20 Fig. 1a: corte longitudinal a través de un casete de ensayo con ambas cámaras de muestra en el cual se guía el fluido a ambas superficies del soporte (1) (lado frontal y lado posterior) en el flujo (3) en paralelo entre sí. El casete es presurizado a través de la abertura de entrada (5), de modo que el fluido fluya desde allí hacia la abertura de salida y desde allí a través de otro canal hacia el residuo (4) (cámara auxiliar (arriba)) (ejemplo comparativo).

25 Fig. 1b: corte longitudinal a través de una cámara de muestra en la cual fluye el fluido en el extremo del soporte (1) a través de otro canal se transporta al lado posterior del soporte influye en la segunda superficie (lado posterior) de modo antiparalelo a la primera superficie.

30 Fig. 2: vista superior de una cámara de muestra. Puede disponerse una cantidad de soportes en paralelo en un casete. Para este propósito, el flujo puede dividirse o los soportes pueden localizarse conjuntamente en un espacio hueco.

35 Fig. 3: corte longitudinal detallado de una forma de realización, no mostrado a escala. Las soluciones se introducen a través de la abertura de entrada (5) y el flujo (3) sobre el lado frontal del soporte fijado (1), sobre el cual se localizan los reactivos de ensayo (2). Desde allí, las soluciones pasan a través de otro canal en el otro extremo del soporte hacia el lado posterior del soporte y fluyen sobre este hacia una abertura de salida. Un canal adicional transporta los fluidos hacia el residuo (4), el cual contiene preferiblemente un material absorbente. La cámara para el residuo se conecta con el mundo exterior a través de un conducto de ventilación. Este conducto de ventilación puede proveerse de una traba y otras cámaras para impedir una fuga del residuo.

40 Fig. 4: inmunoensayo con tres membranas idénticas como fase sólida, realizados simultáneamente de acuerdo con el protocolo del ejemplo 1. En las pistas 1 y 2 el fluido fluye sobre las membranas desde ambos lados, y la pista 3 el fluido fluye sobre el lado superior solamente. Se usaron reactivos y volúmenes idénticos en todas las pistas.

45 Fig. 5: corte longitudinal en forma de dibujo desclasado para explicación de la estructura en capas del casete de ensayo. Las películas se localizan en cada caso entre un hemisferio moldeado por inyección que es transparente en algunas regiones y una parte media que igualmente es moldeada por inyección. El láser suelda, a través de los hemisferios, la película al hemisferio y la parte media y también suelda los hemisferios y la parte media entre sí.

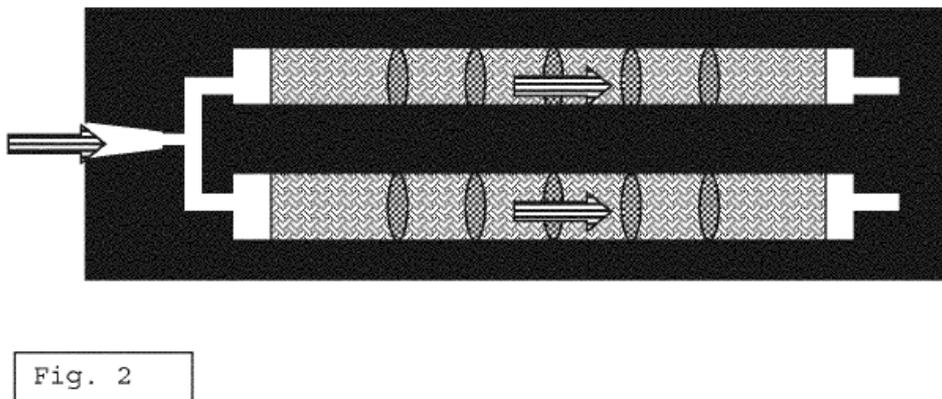
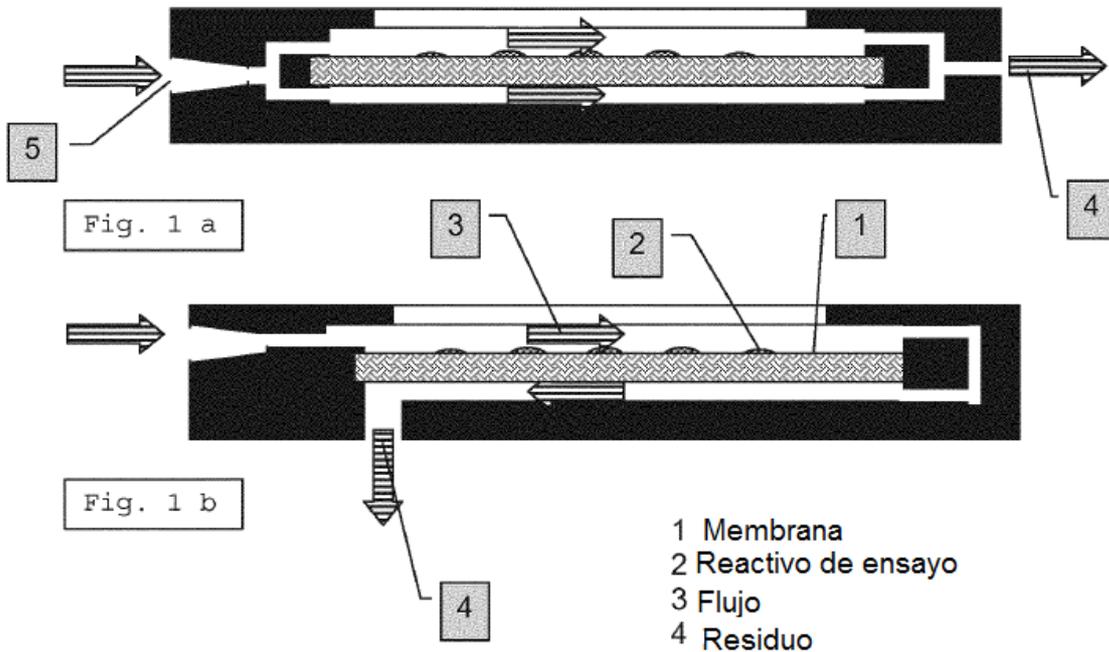
50 Fig. 6: vista superior detallada del soporte, no fiel a escala. El soporte es sujetado mediante apriete por debajo del cubrejuntas de la película y cubre la cavidad en la película.

55 Fig. 7: corte transversal a través de un casete de ensayo, no fiel a escala. El soporte se fija en los bordes de las cámaras de muestra. Cualquier curvatura del soporte en la dirección transversal se muestra muy exagerada. Si una curvatura se presenta o se origina después de humedecer, el soporte se inserta preferiblemente de modo que la curvatura se forme hacia el lado frontal.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de ensayo in vitro para la detección de al menos un analito en un fluido de muestra, en donde se usa un dispositivo que comprende dos cámaras de muestra, las cuales están separadas por un soporte con al menos dos superficies, en donde un lado frontal del soporte apunta a la primera cámara de muestra y un lado posterior del soporte apunta a la segunda cámara de muestra, y
- 5 a) al menos una molécula receptora se fija en el lado frontal de un soporte,
- 10 b) al menos un volumen libre se forma sobre el lado frontal y el lado posterior del soporte respectivamente; dicho volumen libre está delimitado por una pared de cámara,
- c) la primera cámara de muestra presenta al menos dos aberturas, en cuyo caso un fluido de muestra fluye a través de una primera abertura a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado frontal del soporte hacia la segunda abertura distanciada del soporte,
- 15 d) la segunda cámara de muestra presenta al menos dos aberturas, en cuyo caso el líquido de muestra fluye a través de una primera abertura desde la primera cámara de muestra a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado posterior del soporte hacia la segunda abertura,
- 20 e) la segunda abertura de la primera cámara de muestra y la primera abertura de la segunda cámara de muestra están unidas entre sí por un canal, en donde este canal es más pequeño en diámetro que el diámetro de la cámara de muestra o del volumen libre, y en donde el flujo total de fluido de muestra pasa entre las dos cámaras de muestra a través del canal entre las cámaras de muestra
- 25 f) la segunda abertura de la segunda cámara de muestra permite la descarga del fluido,
- g) los volúmenes libres de b.) Se forman al menos parcialmente con una columna de fluido,
- 30 h) en donde el gradiente de corriente a lo largo del lado frontal y posterior del soporte se efectúa por medio de aplicación de presión y arrastra la corriente de fluido de g.), en donde la al menos una molécula receptora se enlaza al menos con un analito del fluido de muestra.
- 35 2. Procedimiento de ensayo para la detección de al menos un analito de un fluido de muestra según la reivindicación 1, que comprende dos cámaras de muestra que están separadas por un soporte con al menos dos superficies, en cuyo caso el soporte es parcialmente permeable para un fluido de muestra.
- 40 3. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el canal rodea un elemento de sujeción, principalmente un puntal transversal, del soporte y una perforación redonda.
4. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde la descarga de la segunda cámara de muestra se conecta por medio de un canal con otra cámara, en donde esta tercera cámara
- 45 a) contiene parcialmente un material absorbente y
- b) contiene un sistema de ventilación que está diseñado preferentemente como canal y de manera particularmente preferida como canal con al menos un pliegue o al menos otra cámara.
- 50 5. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el casete de ensayo se compone de tres componentes fabricados mediante moldeo por inyección y estos son un hemisferio, una parte media y un hemisferio, donde entre al menos un hemisferio y la parte media se encuentra al menos una película que está provista de al menos una cavidad y al menos cubrejuntas para alojar soportes, en cuyo caso de modo particularmente preferido se encuentra otra película entre la parte media y el segundo hemisferio y estos componentes se unen entre sí por medio de soldadura de láser y, principalmente, por medio de soldadura de máscara de láser.
- 55 6. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde la distancia del lado frontal o lado posterior del soporte hacia la pared de la cámara es de 10  $\mu\text{m}$  y más, principalmente hasta 1500  $\mu\text{m}$ .
- 60 7. Procedimiento de ensayo según la reivindicación 6, en donde la distancia es de 80  $\mu\text{m}$  a 350  $\mu\text{m}$ , principalmente 120  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ , en cuyo caso de manera opcional las distancias del lado frontal y posterior del soporte son diferentes.
- 65 8. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el soporte se compone de un material sólido, total o parcialmente de una membrana de tipo gel, porosa, de tipo tamiz, permeable o semipermeable, membrana de diálisis, principalmente una membrana recubierta o no recubierta.

9. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos una molécula receptora se fija sobre una segunda superficie de un soporte.
- 5 10. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el fluido de muestra es un fluido biológico o no biológico, principalmente sangre entera, semi-sangre, plasma, suelo, saliva, líquido de lágrimas, orina, secreción, líquido cerebral o formas tratadas de tales fluidos, soluciones que contienen bacterias, sustancias activas, principalmente fluidos estabilizados con EDTA.
- 10 11. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la aplicación de presión se realiza mediante sobrepresión o presión negativa, principalmente con ayuda de una jeringa, ampolla, bomba o fuelle.
- 15 12. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en caso de una entrada de un líquido de muestra, que incluye 300 µl de diluyente de muestra, de 340-540 µl, principalmente 350 - 370 µl para plasma y 480 -520 µl para sangre en calidad de fluido de muestra, la cámara de muestra se configura tal como sigue: longitud del soporte 40 - 60 mm, anchura del soporte 2,0 - 10 mm, diámetro de entrada 0,15 mm a 0,45.
- 20 13. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se suministra al menos un fluido de muestra a varias cámaras de muestra en paralelo desde un canal de muestra.
- 25 14. Procedimiento de ensayo según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se usan anticuerpos para la detección del analito.
- 30 15. Uso de un kit para la detección de al menos un analito de un fluido de muestra in vitro de la reivindicación 1, que comprende un dispositivo que comprende dos cámaras de muestra, las cuales están separadas por un soporte con al menos dos superficies, en donde un lado frontal del soporte apunta a la primera cámara de muestra y un lado posterior del soporte apunta a la segunda cámara de muestra, y
- 35 a) al menos una molécula receptora se fija sobre el lado frontal de un soporte,
- b) al menos un volumen libre se forma sobre el lado frontal y el lado posterior del soporte y dicho volumen libre está delimitado por una pared de cámara,
- 40 c) la primera cámara de muestra presenta al menos dos aberturas, en cuyo caso un fluido de muestra fluye a través de una primera abertura a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado frontal del soporte hacia la segunda abertura distanciada del soporte,
- 45 d) la segunda cámara de muestra presenta al menos dos aberturas, en cuyo caso el fluido de muestra fluye a través de una primera abertura desde la primera cámara de muestra a lo largo de un gradiente de flujo sobre el lado posterior del soporte y hacia la segunda abertura en dirección opuesta al flujo sobre el lado frontal del soporte,
- e) la segunda abertura de la primera cámara de muestra y la primera abertura de la segunda cámara de muestra están unidas entre sí por un canal, en cuyo caso este canal es más pequeño en diámetro que el diámetro de la cámara de muestra o del volumen libre, y toda la corriente de fluido de muestra entre las dos cámaras de muestra pasa por el canal entre las cámaras de muestra,
- 50 f) la segunda abertura de la segunda cámara de muestra habilita la descarga del fluido,
- g) los volúmenes libres de b.) se forman al menos parcialmente con una columna de fluido,
- h) en donde el gradiente de corriente a lo largo del lado frontal y lado posterior del soporte se efectúa por medio de aplicación de presión y arrastra la columna de fluido de g.), en donde la al menos una molécula receptora se enlaza al menos con un analito del fluido de muestra.
- 55 16. Uso de un kit según la reivindicación 15 o de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14 para la detección de al menos un analito (sustancias) de un fluido de muestra en el diagnóstico humano, médico veterinario o vegetal, el diagnóstico de alimentos, el diagnóstico ambiental, el diagnóstico forense, la farmacología, la toxicología, en caso de alergia, enfermedades auto-inmunes o metabólicas, enfermedades infecciosas, enfermedades de transmisión sexual, intolerancias a alimentos, enfermedades parasitarias, determinación de moléculas pequeñas como drogas, medicamentos o productos del metabolismo, mediadores de células, tipificación de tejido, tipificación de tipos, tipificación de alimentos, tipificación de antígenos, tipificación de epítipo y detección de ADN o ARN.
- 60



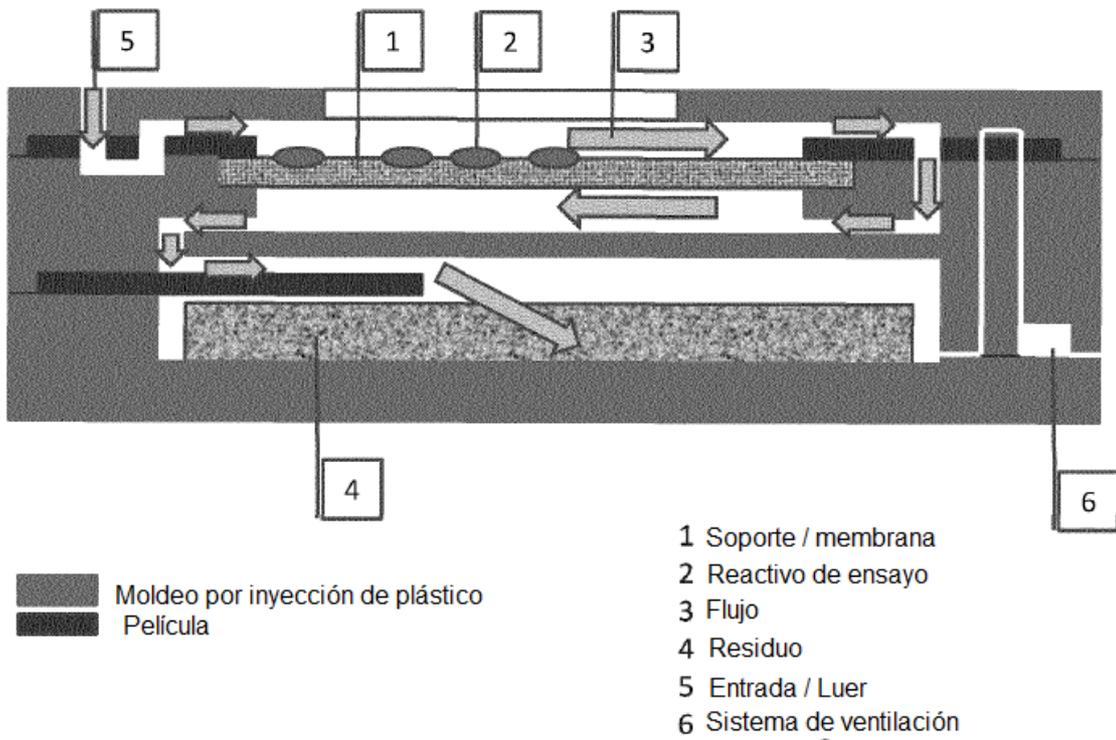
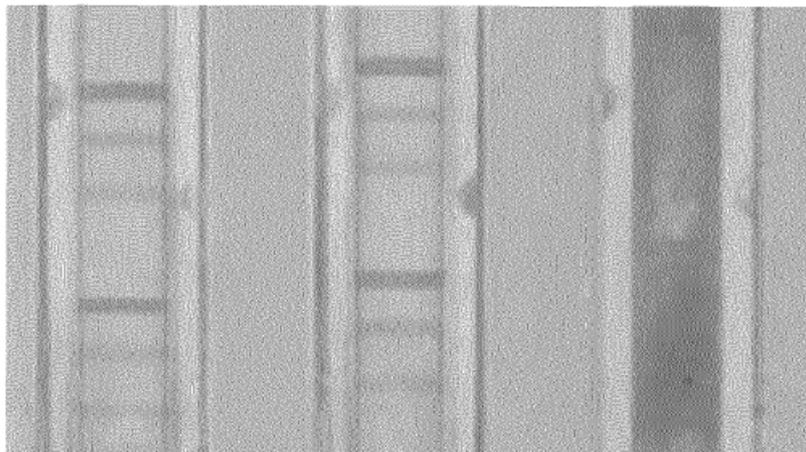


Fig. 3



Pista 1

Pista 2

Pista 3

Fig. 4

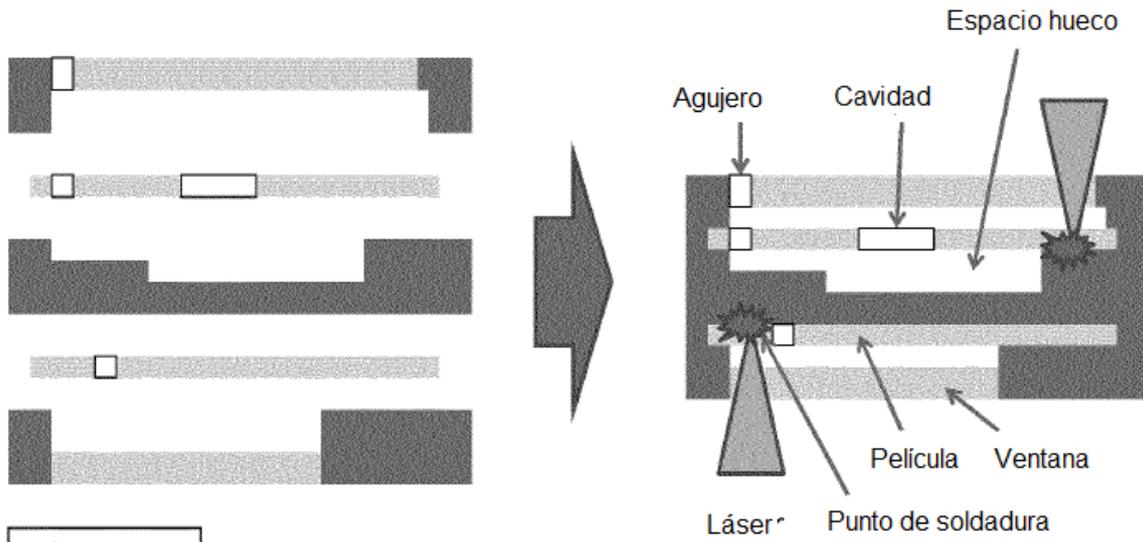


Fig. 5

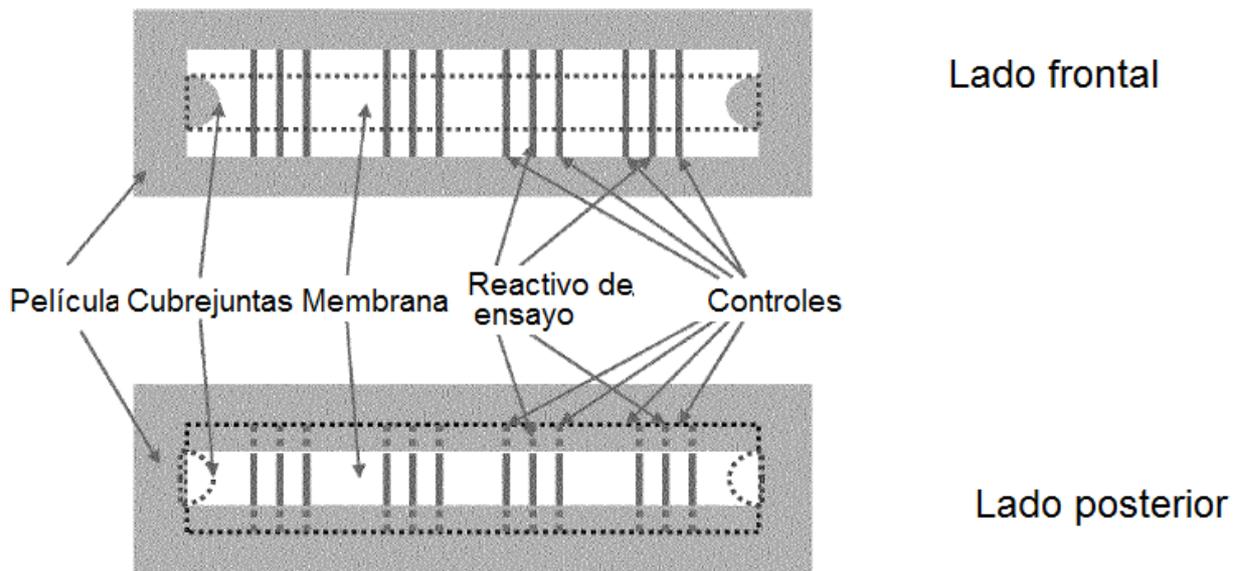


Fig. 6

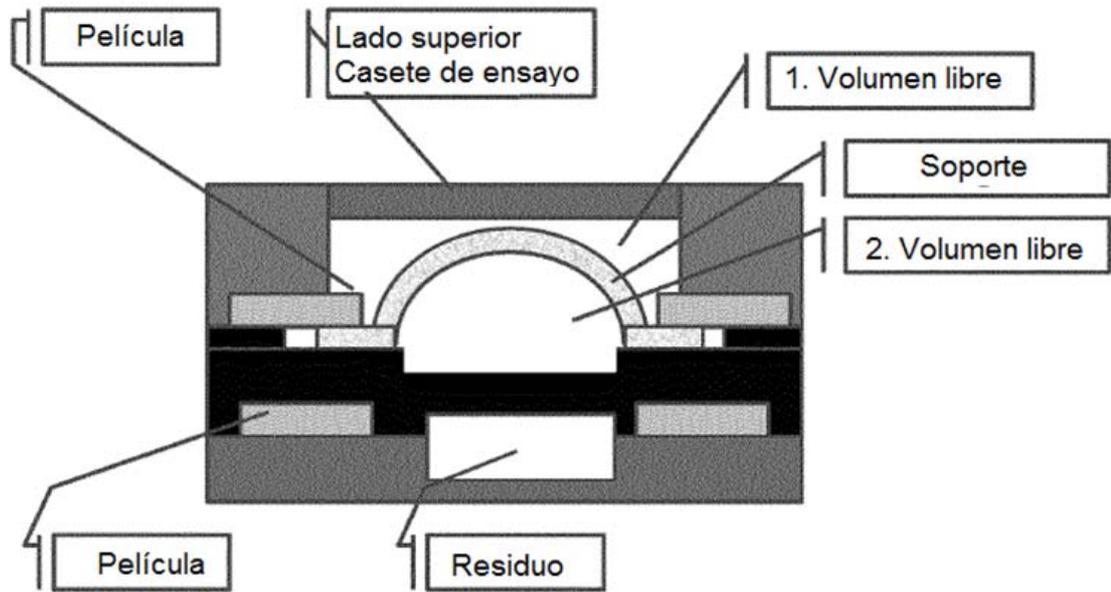


Fig. 7