



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 176**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06808820 .2**

96 Fecha de presentación : **23.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1917529**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54

Título: **Dosificación de un analito mediante inmunocromatografía de migración lateral.**

30

Prioridad: **23.08.2005 FR 05 08685**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2010**

73

Titular/es: **Vedalab**  
**ZAT du Londeau, rue de l'expansion, Cerise**  
**61000 Alençon, FR**

72

Inventor/es: **Donati, Raphaël**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 347 176 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**

Dosificación de un analito mediante inmunocromatografía de migración lateral.

5 La presente invención se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico de migración lateral que permite simultáneamente la determinación de un analito en una muestra líquida mediante un ensayo sándwich y mediante un ensayo de competición.

10 Unos dispositivos inmunocromatográficos de migración lateral se describen por ejemplo en la patente EP 0 284 232. Estos dispositivos utilizan un medio de difusión capilar en forma de un soporte sólido poroso en el seno del cual la muestra y los agentes reactivos migran mediante difusión capilar. Estos dispositivos integran o comprenden así un soporte sólido poroso (o inmunocromatográfico) que comprende una primera zona que soporta en forma liofilizada, seca, o deshidratada, un agente reactivo de unión específica del analito conjugado con un marcador visible y/o medible, y una zona de detección en la que se inmoviliza un agente reactivo de captura específica del analito. El agente reactivo de unión específica del analito es inmóvil en forma seca, pero se vuelve móvil en el soporte sólido en el estado húmedo. Así, cuando el soporte sólido se pone en contacto con una muestra líquida, esta última migra por difusión capilar en este soporte arrastrando el agente de unión específica del analito conjugado con el marcador visible y/o medible. La muestra y el agente reactivo de unión específica del analito migran por difusión capilar en el soporte sólido hasta la zona de detección que soporta el agente reactivo de captura específico del analito inmovilizado.

20 Se conocen a partir del documento WO 2004/088320 unos procedimientos inmunocromatográficos en fase sólida en los que el agente reactivo de unión, conjugado con un marcador visible y/o medible se añade extemporáneamente en forma líquida.

25 Estos dispositivos permiten clásicamente la detección del analito, o bien mediante un ensayo sándwich, o bien mediante un ensayo de competición.

30 En un ensayo sándwich, el agente reactivo de unión marcado se une al analito, y este último se inmoviliza sobre el soporte sólido mediante el agente reactivo de captura. La presencia o la ausencia del analito en la muestra se mide mediante la presencia o no de una señal visible o medible, a nivel del agente reactivo de captura.

35 En un ensayo de competición, el analito y el agente reactivo de unión están en competición para unirse al agente reactivo de captura. La presencia o la ausencia del analito en la muestra se miden mediante la ausencia o no de una señal visible o medible, a nivel del agente reactivo de captura.

40 Las patentes EP 0 291 194, EP 0 560 411 y EP 0 560 410 describen unos dispositivos en los que el soporte sólido inmunocromatográfico en una sola parte es incorporado en una caja provista de una abertura para el depósito de la muestra líquida, y de una ventana de observación para la lectura del resultado.

45 La patente EP 1 091 808 describe unos dispositivos mejorados que comprenden asimismo un soporte sólido poroso en varias partes, con un órgano de captación de la muestra líquida, móvil, que permite una mejor recogida de la muestra.

50 Estos dispositivos se pueden adaptar a un uso único y doméstico. En efecto, son de un uso fácil y rápido, necesitan sólo poca manipulación puesto que todos los agentes reactivos están integrados o comprendidos en el dispositivo.

55 Sin embargo, estos ensayos inmunocromatográficos en fase sólida no permiten una determinación cuantitativa del analito en la muestra.

60 Además, en ensayo sándwich, se observa para algunos analitos un efecto “gancho” o efecto “hook”. El efecto gancho es un efecto indeseable bien conocido en los ensayos inmunológicos. Se produce cuando el analito está presente en la muestra a una concentración muy elevada. El efecto gancho puede entonces provocar unos falsos negativos, que concluyen de manera aberrante en la ausencia del analito en la muestra.

65 Los analitos que presentan un efecto gancho durante dosificaciones inmunológicas de tipo sándwich presentan unas curvas señal/concentración de tipo curva de Gauss (véase la figura 1). La figura 1 muestra que a una señal dada (S) corresponden dos concentraciones posibles del analito (C1 y C2), una débil (C1) y la otra elevada (C2) durante la lectura del resultado a un tiempo definido.

70 Las curvas señal/concentración para las dosificaciones mediante competición están representadas en la figura 2. Para un ensayo mediante competición, existe efectivamente la obtención de dos señales diferentes (S1 y S2) para dos concentraciones respectivamente diferentes (C1 y C2) del analito a determinar. Sin embargo, los ensayos mediante competición muestran asimismo muy rápidamente sus límites, debido a que existe una extinción de la señal a unas concentraciones relativamente poco elevadas de analito.

75 Una solución comúnmente adoptada para evitar estos inconvenientes de los ensayos sándwich y de los ensayos de competición consiste en determinar el analito a partir de una gama de dilución de la muestra líquida. El uso de una gama de dilución no conviene sin embargo para un uso doméstico. Además, el uso de una gama de dilución de la

## ES 2 347 176 T3

muestra necesita unas manipulaciones suplementarias y un consumo aumentado de dispositivos de ensayo a uso único, puesto que cada muestra se ensaya varias veces a diferentes diluciones.

5 De acuerdo con el documento DE 10054093, se propone un dispositivo de inmunofiltración constituido por dos partes distintas o independientes, asignadas respectivamente a un ensayo de tipo sándwich y a un ensayo de tipo competición. Con este dispositivo, un agente reactivo de unión específica conjugado con un marcador fluorescente se mezcla extemporáneamente con el analito. La mezcla obtenida se divide después en dos porciones. Una primera porción se filtra en la parte sándwich, y reacciona con un segundo agente reactivo de unión, inmovilizado, y una segunda porción se filtra en la parte de competición del dispositivo, y reacciona con un agente reactivo de captura, inmovilizado, idéntico al analito, o un análogo del analito. Las señales fluorescentes respectivamente obtenidas permiten la determinación del analito.

15 Este dispositivo no es susceptible de mejorar la sensibilidad o la precisión de la determinación del analito, puesto que cada ensayo elemental trabaja con la concentración de partida del agente reactivo de unión específica.

De acuerdo con el documento US 2005/0112729 (véase en particular el párrafo 0063 y la reivindicación 1), se ha descrito un dispositivo para la determinación de un complejo entre un analito y un primer agente reactivo de unión específica, marcado, comprendiendo este dispositivo:

- 20 - un medio de difusión capilar,
- en una zona denominada de competición del medio de difusión capilar, un segundo agente reactivo de unión específica del analito, inmovilizado, y complejado con un ligando, asimismo marcado,
- 25 - en una zona denominada de detección del medio de difusión capilar; un agente reactivo de captura, inmovilizado, susceptible de unirse tanto al complejo citado anteriormente como al ligando marcado, siendo este último susceptible de ser desplazado o descomplejado en la zona de competición mediante el flujo de dicho complejo sobre el medio de difusión capilar.

30 La determinación del analito se obtiene a partir de las señales obtenidas en las zonas de competición y de detección.

El formato de este ensayo es complejo de utilizar, y se justifica sólo para unas determinaciones del analito de gran precisión.

35 El documento US-A-5.962.339 describe un ensayo que comprende una zona 5 denominada "threshold" y una zona 6 denominada "detección". El dispositivo descrito no propone simultáneamente en la misma membrana una dosificación del analito mediante sándwich y una dosificación del analito mediante competición.

40 La presente invención tiene por objetivo evitar los inconvenientes de los dispositivos mencionados anteriormente. En particular, la presente invención tiene por objeto, por un lado, un dispositivo de ensayo y, por otro lado, un modo de uso de este último, que permite una determinación del analito, con un grado de fiabilidad y/o de precisión suficiente, en cualquier circunstancia, es decir, sea cual sea la concentración de partida de este último, en particular cuando esta concentración es relativamente fuerte o relativamente baja.

45 Según la invención, haciendo referencia a la figura 3, se propone un dispositivo de determinación de un analito en una muestra líquida, que comprende:

- 50 - un medio de difusión capilar 1, mediante migración lateral que determina una dirección de referencia 2 de difusión capilar, que comprende una zona de depósito 3 de la muestra líquida, y una zona de detección 5 del analito, dispuesta corriente abajo de dicha zona de depósito,
- un primer agente reactivo 4 de unión específica del analito, conjugado con un marcador visible y/o medible, libre de migrar en el estado húmedo, por difusión capilar, en el medio de difusión capilar 1, según la dirección de referencia, siendo la zona de disposición del primer agente reactivo confundida con la zona de depósito (3) de la muestra, o estando dispuesta corriente abajo de esta última, pero corriente arriba de la zona de detección (5),
- 55 - un segundo agente reactivo 6 de unión específica del analito, inmovilizado, en la zona de detección 5.

60 caracterizado porque la zona de detección 5 comprende un tercer agente reactivo constituido por el analito, o un análogo del analito, inmovilizado, y dispuesto a distancia del segundo agente reactivo 6 de unión específica corriente abajo de éste.

Este dispositivo presenta, de manera preferida, una o varias de las características secundarias siguientes, consideradas solas o en combinación, todavía explicadas haciendo referencia a la figura 3:

- 65 - este dispositivo puede comprender un órgano de captación de la muestra líquida, independiente del medio de difusión capilar, susceptible de ser llevado en contacto con la zona de depósito, para un flujo de dicha muestra en dicha zona de depósito

## ES 2 347 176 T3

- el medio de difusión capilar 1 puede comprender una zona de disposición del primer agente reactivo (4) de unión, en el estado seco y libre, en o sobre dicho medio de difusión capilar;
- el segundo agente reactivo 6 de unión específica, y/o el analito 7, o el análogo de analito, están dispuestos, por ejemplo, sobre el medio de difusión capilar según una línea transversal a la dirección de referencia
- el medio de difusión capilar puede comprender una zona de control (C), corriente abajo de la zona de detección 5.

Según la presente invención, se entiende mediante la expresión “medio de difusión capilar” cualquier medio que constituye o que actúa como unidad de difusión capilar continua, mediante migración lateral (es decir, perpendicularmente al espesor del o de los materiales capilares utilizados para la difusión capilar). Dicho medio de difusión capilar es, por ejemplo, un soporte alargado según la dirección y/o el sentido de la difusión capilar (migración lateral), constituido por un solo y mismo material capilar o poroso, o mediante varios elementos o materiales capilares diferentes, dispuestos unos con relación a los otros, por ejemplo, mediante superposición, para obtener una continuidad de flujo capilar de un elemento o de un material a otro, según la dirección de difusión capilar.

Dicho medio de difusión capilar determina una dirección y/o un sentido de difusión capilar de cualquier líquido que se recibe o que se deposita en un extremo hacia el otro extremo de dicho medio.

La difusión capilar considerada según la presente invención, o inmunocromatografía por migración lateral, se distingue de la utilizada en las técnicas de inmunofiltración, según las cuales los líquidos permean en el espesor del o de los materiales de filtración, porosos.

Según la presente invención, el analito, o el análogo del analito considerado, constituye un tercer agente reactivo, encima de los primer y segundo agentes reactivos de unión. Este tercer agente reactivo está fijado o inmobilizado en la zona de detección mediante cualquier medio apropiado. Este tercer agente reactivo sobre el medio de difusión capilar está disponible para reaccionar específicamente con el primer agente reactivo de unión específica, con la exclusión de cualquier otra entidad. En particular, una vez depositado sobre el medio de difusión capilar, no se compleja con cualquier otra entidad, o agente reactivo, por ejemplo conjugado con un marcador visible y/o medible.

Dicho dispositivo se puede utilizar según el procedimiento o modo de uso definido a continuación, haciendo referencia a la figura 3:

- se deposita en la zona de depósito del medio de difusión capilar, la muestra líquida,
- se espera un tiempo suficiente para la migración por difusión capilar de la muestra líquida hasta la zona de detección 5,
- se observa en la zona de detección la medición en la que, por un lado, el agente reactivo 4 de unión específica complejo con el analito se fija al segundo agente reactivo 6 de unión específica, obteniendo una primera señal y, por otro lado, el primer agente reactivo de unión no complejo se fija al tercer agente reactivo constituido por el analito 7, o análogo de analito, obteniendo una segunda señal,
- se determina el analito a partir de las primera y segunda señales.

Preferentemente, según la invención, la cantidad del primer agente reactivo 4 de unión es excedentario con relación a la cantidad del analito presente en la muestra líquida, o del número de sitios de complejación con el primer agente reactivo de unión, presentes en dicha muestra líquida.

En un modo cualitativo, una concentración baja en analito se detecta mediante la ausencia de la primera señal y la presencia de la segunda señal; y una concentración importante en analito se detecta mediante la ausencia de las dos señales. Una concentración normal del analito se detecta mediante la presencia de las primera y segunda señales.

Ventajosamente, los dispositivos y/o los procedimientos según la presente invención permiten dosificar unos analitos débilmente o muy altamente concentrados en una muestra sin obtener ningún resultado de falsos positivos o de falsos negativos. Además, de manera sorprendente, los dispositivos y/o los procedimientos según la presente invención permiten la dosificación cuantitativa del analito.

Los dispositivos y/o los procedimientos según la invención están particularmente adaptados a la dosificación de analitos que presentan un efecto gancho importante tal como la hormona de embarazo (hCG), la proteína C-reactiva, la albúmina, etc.

**Descripción de la invención**

La presente invención se refiere por lo tanto a un dispositivo de determinación de un analito en una muestra líquida, que comprende un medio de difusión capilar (1) que comprende en la dirección de difusión capilar (2):

- a) una zona de depósito o de recepción de la muestra (3);
- b) un agente reactivo de unión específica del analito conjugado con un marcador visible y/o medible, libre de migrar por difusión capilar en el estado húmedo en el medio de difusión capilar (1);
- c) una zona de detección del analito (5);

en el que la zona de detección del analito (5) comprende, sucesivamente, en la dirección de difusión capilar (2), por un lado, un segundo agente reactivo de unión específica del analito (6) inmovilizado y, por otro lado, el analito, o un análogo del analito, inmovilizado (7); de tal manera que el primer agente reactivo de unión específica del analito (4) y el segundo agente reactivo de unión específica del analito (6) permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo sándwich, mientras que el primer agente reactivo de unión específica del analito (4) y el analito, o el análogo del analito, inmovilizado (7) permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo de competición.

En un modo de realización, el primer agente reactivo de unión específica del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, se deposita en el estado seco sobre el soporte, y la invención se refiere por lo tanto a un dispositivo de determinación de un analito en una muestra líquida que comprende un medio de difusión capilar (1) que comprende, en la dirección de difusión capilar (2):

- a) una zona de depósito de la muestra (3);
- b) un primer agente reactivo de unión específica del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, depositado en el estado seco y libre de migrar por difusión capilar en el estado húmedo en el medio de difusión capilar (1);
- c) una zona de detección del analito (5);

en el que la zona de detección del analito (5) comprende, sucesivamente, en la dirección de difusión capilar (2), un segundo agente reactivo de unión específica del analito (6) inmovilizado, y el analito, o un análogo del analito, inmovilizado (7); de tal manera que el primer agente reactivo de unión específica del analito (4) y el segundo agente reactivo de unión específica del analito (6) permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo sándwich, mientras que el primer agente reactivo de unión específica del analito (4) y el analito, o el análogo del analito, inmovilizado (7) permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo de competición.

En otro modo de realización, el primer agente reactivo de unión específica del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, se añade extemporáneamente en forma de agente reactivo en forma líquida.

Mediante la expresión “agente reactivo en forma líquida” se entiende cualquier agente reactivo en el que el agente reactivo de unión está en disolución o en suspensión. La preparación del agente reactivo de unión conjugado con el marcador visible y/o medible en forma líquida se lleva a cabo según unas técnicas descritas en la bibliografía. Habitualmente, el agente reactivo de unión conjugado está en disolución o en suspensión en una disolución salina tamponada. Esta disolución puede comprender asimismo unos agentes estabilizantes y otros compuestos tales como unos antibacterianos o unos antifúngicos. Entre los agentes estabilizantes se citarán, por ejemplo, el suero de albúmina bovina (BSA) y la caseína.

En algunos procedimientos según la presente invención, se utiliza además un diluyente cuando la muestra líquida es plasma, suero o sangre total, por ejemplo. Este diluyente migra en el soporte sólido arrastrando la muestra, y el agente reactivo de unión marcado. Típicamente, este diluyente está compuesto por una disolución salina tamponada, y puede comprender asimismo un detergente o cualquier otro componente necesario para la reacción.

Preferentemente, el primer agente reactivo de unión específica del analito (4) está conjugado con un marcador particular.

Preferentemente, el medio de difusión capilar (1) es una cinta cromatográfica fijada sobre un soporte rígido.

En un modo de realización preferido, el medio de difusión capilar (1) está integrado en un soporte de asido (8) provisto de por lo menos una ventana de observación (9) que permite observar la zona de detección (5).

Mediante la expresión “agente reactivo de unión” se entiende cualquier entidad química, bioquímica o biológica susceptible de unirse específicamente con el analito, o con el agente reactivo de captura en competición con el analito.

## ES 2 347 176 T3

Por el término “unirse” o “unión” se entiende cualquier unión fuerte, por ejemplo covalente, o cualquier unión débil, por ejemplo de tipo antígeno/anticuerpo o avidina/estreptavidina.

El agente reactivo de unión es, por ejemplo, un anticuerpo, un antígeno o un ácido nucleico.

En un ensayo por competición, el agente reactivo de unión está en fase sólida y está fijado al analito en sí, o un análogo apropiado del analito. Mediante la expresión “análogo apropiado del analito” se entiende cualquier entidad que se une de manera específica al primer agente reactivo de unión específica del analito, en competición con el analito.

En un ensayo de tipo sándwich, el primer agente reactivo de unión marcado es un anti-analito conjugado con un marcador visible y/o medible, por ejemplo un anticuerpo específico del analito, conjugado con dicho marcador.

En un ensayo de tipo sándwich, el segundo agente reactivo de unión se une de manera específica al analito. El segundo agente reactivo de unión marcado es por lo tanto asimismo un anti-analito, por ejemplo un anticuerpo específico del analito conjugado con un marcador visible y/o medible.

Mediante la expresión “marcador visible y/o medible” se entiende cualquier procedimiento de marcado que permite una detección directa o indirecta a simple vista o con la ayuda de un aparato, debido a la emisión de una señal, siendo dicha señal por ejemplo una fluorescencia, una coloración, una presencia de isótopo, o una señal magnética. Se citarán, por ejemplo, los marcadores particulares coloreados como el oro coloidal, o fluorescentes, las partículas de látex coloreadas, las partículas de látex fluorescentes y las partículas conjugadas con la avidina y con la estreptavidina.

La presente invención se refiere por lo tanto a un dispositivo de determinación de un analito en una muestra líquida, que comprende un medio de difusión capilar (1), que comprende en la dirección de difusión capilar (2):

- a) una zona de depósito o de recepción de la muestra (3);
- b) un primer anticuerpo específico del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, libre de migrar por difusión capilar en el estado húmedo en el medio de difusión capilar (1);
- c) una zona de detección del analito (5);

dispositivo en el que la zona de detección del analito (5) comprende, sucesivamente, en la dirección de difusión capilar (2), por un lado, un segundo anticuerpo específico del analito (6) inmovilizado y, por otro lado, el analito, o un análogo del analito, inmovilizado (7); de tal manera que el primer anticuerpo específico del analito (4) y el segundo anticuerpo específico del analito (6) permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo sándwich, mientras que, por un lado, el primer anticuerpo específico del analito (4) y, por otro lado, el analito, o el análogo del analito, inmovilizado (7), permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo de competición.

En un modo de realización, el primer anticuerpo específico del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, se deposita en el estado seco sobre el soporte, y la invención se refiere entonces a un dispositivo de determinación de un analito en una muestra líquida, que comprende un medio de difusión capilar (1), y que comprende en la dirección de difusión capilar (2):

- a) una zona de depósito o de recepción de la muestra (3);
- b) un primer anticuerpo específico del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, depositado en el estado seco y libre de migrar por difusión capilar en el estado húmedo en el medio de difusión capilar (1);
- c) una zona de detección del analito (5);

dispositivo en el que la zona de detección del analito (5) comprende, sucesivamente, en la dirección de difusión capilar (2), por un lado, un segundo anticuerpo específico del analito (6) inmovilizado y, por otro lado, el analito, o un análogo del analito, inmovilizado (7); de tal manera que el primer anticuerpo específico del analito (4) y el segundo anticuerpo específico del analito (6) permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo sándwich, mientras que, por un lado, el primer anticuerpo específico del analito (4) y, por otro lado, el analito, o el análogo del analito, inmovilizado (7), permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo de competición.

En otro modo de realización, el primer anticuerpo específico del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, se añade extemporáneamente en forma de agente reactivo en forma líquida.

Preferentemente, el primer anticuerpo específico del analito (4) se conjuga con un marcador visible y/o medible.

Preferentemente, el medio de difusión capilar (1) es una cinta cromatográfica fijada sobre un soporte rígido.

## ES 2 347 176 T3

En un modo de realización preferido, el medio de difusión capilar (1) está integrado en un soporte de asido (8) provisto de por lo menos una ventana de observación (9) que permite observar la zona de detección (5).

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de determinación de un analito en una muestra líquida, que utiliza un dispositivo tal como se ha definido anteriormente, que comprende las etapas siguientes:

- a) disponer de por lo menos un medio de difusión capilar provisto de por lo menos una zona de depósito o de recepción, y de una zona de detección, estando por lo menos un agente reactivo de captura inmovilizado en la zona de detección,
- b) depositar, separadamente en la zona de depósito del medio de difusión capilar, por lo menos una vez la muestra líquida,
- c) esperar un tiempo suficiente para la migración por difusión capilar de la muestra líquida hasta la zona que comprende el primer agente reactivo de unión específica, conjugado con un marcador visible y/o medible,
- d) esperar un tiempo suficiente para la migración por difusión capilar del primer agente reactivo de unión específica conjugado con un marcado visible y/o medible y de la muestra líquida hasta la zona de detección,
- e) observar la medición en la que el agente reactivo de unión específica conjugado con un marcador visible y/o medible se fija en la zona de detección, para la determinación del analito simultáneamente mediante un ensayo sándwich y mediante un ensayo de competición.

Según un modo de realización, el primer agente reactivo de unión específica conjugado con un marcador visible y/o medible se deposita, en el estado seco y libre, en o sobre el soporte sólido poroso.

Según un modo de realización, el primer agente reactivo de unión específica conjugado con un marcador visible y/o medible, se añade extemporáneamente, en forma de agente reactivo en forma líquida, simultánea, posterior o previamente al depósito del analito.

Según un modo de realización, se añade o se deposita asimismo un diluyente en forma líquida sobre el soporte sólido poroso.

Según un modo de realización del procedimiento, en la etapa a), la zona de detección comprende por lo menos dos agentes reactivos de captura, siendo uno de los dos el analito o un análogo del analito inmovilizado, y siendo el otro un agente reactivo de unión específica del analito inmovilizado.

Mediante la expresión “agente reactivo de captura” se entiende cualquier entidad química, bioquímica o biológica susceptible de unirse específicamente con el analito, o un análogo del analito.

En el caso de un ensayo mediante competición, el agente reactivo de captura se une asimismo al primer agente reactivo de unión. El analito y el agente reactivo de captura forman típicamente un par ligando/anti-ligando, antígeno/anticuerpo, ADN/ARN o ADN/ADN. Así, si el analito es un antígeno o un hapteno, el agente reactivo de captura es, por ejemplo, un anticuerpo específico del analito. Si el analito es un anticuerpo, el agente reactivo de captura es el antígeno reconocido por el anticuerpo o un anticuerpo que reconoce específicamente el analito. Si el analito es un ácido nucleico, el agente reactivo de captura es, por ejemplo, una sonda ADN complementaria.

El agente reactivo de captura inmovilizado es, por ejemplo, un anticuerpo policlonal o monoclonal que tiene una fuerte afinidad para el analito, y más particularmente puede tratarse de un anticuerpo monoclonal.

Para aumentar la sensibilidad, se puede recurrir, por ejemplo, a un anticuerpo marcado según unas técnicas conocidas por el experto en la materia para una detección indirecta, tal como, por ejemplo, un anticuerpo biotinilado, que permite indirectamente una detección por la formación de las entidades avidina-biotina y estreptavidina-biotina.

Este anticuerpo marcado y biotinilado puede asimismo, o bien ser directamente ya depositado sobre una línea-ensayo, en la zona de detección, para aumentar la sensibilidad, o bien ser depositado con el primer anticuerpo específico y ser eluido y fijado de manera que el analito y el anticuerpo aumentan el tiempo de contacto y también la sensibilidad en particular, por ejemplo, debido al número de sitios de fijación.

El agente reactivo de captura específico del analito está inmovilizado sobre el soporte sólido según unas técnicas conocidas por el experto en la materia. Este agente reactivo de captura se inmoviliza de tal manera que no sea móvil en el estado húmedo. Esta inmovilización puede efectuarse por ejemplo mediante absorción o mediante un acoplamiento covalente.

Por el término “anti-analito” se entiende cualquier entidad química, bioquímica o biológica, susceptible de unirse específicamente con el analito, o con el agente reactivo de captura, en competición con el analito, por ejemplo un anticuerpo, un antígeno o un ácido nucleico.

## ES 2 347 176 T3

Según un modo de realización, la invención se refiere asimismo a un procedimiento de determinación de un analito en una muestra líquida, que comprende las etapas siguientes:

- a) se dispone de un dispositivo tal como se ha definido anteriormente,
- b) se deposita una muestra líquida en la zona de depósito o de recepción (3) del medio de difusión capilar (1) del dispositivo de la etapa (a);
- c) se espera un tiempo suficiente para la migración por difusión capilar de la muestra líquida desde la zona de depósito o de recepción (3) hasta la zona de detección (5), arrastrando el primer anticuerpo específico del analito, conjugado con un marcador visible y/o medible (4);
- d) se observa la medición en la que el primer anticuerpo específico del analito conjugado con un marcador visible y/o medible (4) se fija en la zona de detección (5), para la determinación del analito, simultáneamente mediante un ensayo sándwich y mediante un ensayo de competición. En un modo de realización ventajoso, en la etapa b) se deposita una muestra líquida y un diluyente en la zona de depósito o de recepción (3) del medio de difusión capilar (1) del dispositivo de la etapa (a).

Por el término “analito” se entiende cualquier entidad química, bioquímica o biológica que se desea detectar en una muestra. Entre los analitos detectados por los dispositivos y los procedimientos según la presente invención, se citarán en particular las proteínas, los péptidos, los anticuerpos, las hormonas, los esteroides, los antígenos derivados de agentes infecciosos o de células tumorales, los agentes infecciosos tales como las bacterias, los virus o los parásitos, los ácidos nucleicos (ADN o ARN), los compuestos terapéuticos, las drogas o también los antibióticos.

Por el término “detectar” o “determinar” se entiende la determinación de la presencia o de la ausencia de un analito en una muestra, pero también la medición y la cuantificación de un analito en una muestra. En efecto, los rendimientos de los dispositivos y de los procedimientos según la invención permiten la realización de mediciones cuantitativas o semi-cuantitativas.

En un modo de realización particular de la invención, el analito es la hCG (hormona coriagonadotropina), la proteína C-reativa o la albúmina.

Mediante la expresión “muestra líquida” se entiende cualquier muestra en la que el analito buscado está en disolución o en suspensión. Esta muestra líquida puede en particular ser cualquier fluido biológico o corporal. La muestra líquida puede asimismo haber sido obtenida directa o indirectamente a partir de un fluido biológico o corporal. La muestra puede asimismo ser un extracto líquido de una muestra sólida.

Típicamente, la muestra líquida es orina, sangre total, plasma o suero.

En algunos procedimientos según la presente invención, se utiliza un diluyente cuando la muestra líquida es plasma, suero o sangre total por ejemplo. El diluyente se deposita sobre el soporte sólido poroso con la muestra. Alternativamente, el diluyente se deposita sobre el soporte sólido poroso antes o después de la muestra. Este diluyente migra en el soporte sólido, arrastrando, o facilitando la migración de la muestra en el soporte poroso, con el agente reactivo de unión marcado. Típicamente, este diluyente está compuesto por una disolución salina tamponada, y puede comprender asimismo un detergente o cualquier otro componente necesario para la reacción.

Mediante la expresión “medio de difusión capilar” se entiende un soporte poroso que permite la migración de un líquido mediante simple difusión capilar. La porosidad de este soporte permite la difusión capilar (o migración lateral) de la muestra y/o de los agentes reactivos en el estado líquido o húmedo. Dichos medios de difusión capilar se utilizan muy ampliamente en todas las técnicas de inmunocromatografía de migración lateral en particular.

Así, los medios de difusión capilar utilizados en los dispositivos inmunocromatográficos según la invención son bien conocidos por el experto en la materia (véase el documento EP 0 284 232). A título de ejemplo, estos medios de difusión capilar pueden estar constituidos por diversos soportes inmunocromatográficos, por ejemplo de celulosa, de nylon, de nitrocelulosa, de polietileno o de fibra de vidrio.

El medio de difusión capilar puede estar constituido por una o más partes distintas. Las diferentes partes del soporte pueden estar constituidas por materiales diferentes. Cuando el medio de difusión capilar está constituido por diferentes partes o por diferentes materiales, estos elementos están dispuestos de tal manera que permiten la continuidad del flujo capilar en el medio de difusión capilar.

Típicamente, el medio de difusión capilar está constituido por un soporte sólido poroso alargado según la dirección de difusión capilar. Preferentemente, el medio de difusión capilar de los dispositivos según la invención comprende un soporte sólido poroso en forma de cinta inmunocromatográfica. El medio de difusión capilar se presenta por ejemplo en forma de una cinta inmunocromatográfica constituida por varias cintas superpuestas o que se solapan.

## ES 2 347 176 T3

El dispositivo según la invención puede por ejemplo estar constituido por una cinta cromatográfica fijada sobre un soporte sólido. El soporte sólido puede estar constituido por materiales diversos tales como cartón, cartón plastificado o más preferentemente por materiales plásticos. Preferentemente, el soporte rígido está constituido por poliestireno.

5 El medio de difusión capilar comprende una zona de depósito o de recepción de la muestra, y una zona de detección de la muestra. La zona de depósito y la zona de detección son unas zonas distintas y separadas del medio de difusión capilar. Estas zonas están dispuestas de manera que permiten la continuidad del flujo capilar desde la zona de depósito o de recepción, hasta la zona de detección según una dirección de difusión capilar. Típicamente, la zona de depósito y la zona de detección corresponden respectivamente a uno y a otro de los extremos opuestos del medio de difusión capilar. El medio de difusión capilar está así, por ejemplo, constituido por un soporte sólido poroso alargado según la  
10 dirección de difusión capilar, que presenta un extremo proximal y un extremo distal que constituyen respectivamente la zona de depósito y la zona de detección.

Estas zonas pueden, por ejemplo, estar presentes en una misma cinta constituida por un material único. Ventajosamente, un material poroso específico corresponde a cada zona del medio de difusión capilar. Un material absorbente poroso puede, por ejemplo, ser utilizado para la zona de depósito de la muestra. En efecto, la zona de depósito del medio de difusión capilar esta destinada a ser puesta en contacto con un flujo de orina o a recibir una muestra líquida. Se seleccionará por lo tanto un material absorbente adaptado. Estos materiales son bien conocidos por el experto en la materia. Y se puede utilizar otro material absorbente para la zona que recibe el primer agente reactivo de unión  
15 específica, y/o la zona de detección.  
20

La zona de depósito de la muestra del medio de difusión capilar puede cooperar con un órgano de captación en material absorbente. Este órgano de captación puede ser puesto directamente en contacto con un flujo de orina por ejemplo. Tal como se ha descrito en el documento WO 00/00288, el órgano de captación puede ser móvil entre dos  
25 posiciones, una de recogida de la muestra líquida, al margen del medio de difusión capilar, y la otra en continuidad o en contacto capilar con la zona de depósito del medio de difusión capilar.

El medio de difusión capilar soporta, por ejemplo, un primer anticuerpo específico del analito conjugado con un marcador visible y/o medible. Este anticuerpo se deposita en el estado seco en el medio de difusión capilar, y es libre de migrar por difusión capilar en el estado húmedo. Este primer anticuerpo específico del analito puede estar localizado en la zona de depósito o de recepción de la muestra. Pero, este primer anticuerpo puede ser depositado  
30 asimismo en el estado seco, corriente abajo de la zona de depósito o de recepción de la muestra, para cualquier pérdida de agente reactivo mediante un efecto de lavado durante el depósito de la muestra. Así, la muestra líquida se deposita en la zona de depósito del medio de difusión capilar, y después esta muestra migra por difusión capilar a través del medio de difusión capilar, arrastrando entonces el primer anticuerpo específico del analito conjugado con un  
35 marcador.

Ventajosamente, el medio de difusión capilar puede ser incorporado en un soporte de asido. Este soporte de asido facilita la manipulación del medio de difusión capilar, y puede protegerlo asimismo en particular de la humedad.  
40

El soporte de asido puede envolver parcial o totalmente el medio de difusión capilar.

El soporte de asido puede estar constituido por materiales diversos tales como cartón, cartón plastificado o más preferentemente materiales plásticos. De manera ventajosa, el soporte de asido está constituido por un material rígido e impermeable. Estos soporte de asido o cajas se han descrito en particular en las patentes EP 0 291 194, EP 0 560 411, EP 0 560 410 y EP 1 091 808.  
45

Habitualmente, el soporte de asido está en forma de caja.

50 En un modo de realización de la invención, el medio de difusión capilar puede comprender una zona de depósito o de recogida de la muestra, en resalte con relación al soporte de asido, para la recepción de la muestra líquida.

En otro modo de realización de la invención, el soporte de asido o la caja comprende por lo menos una abertura para el depósito de la muestra líquida.  
55

Típicamente, el soporte de asido está provisto asimismo de por lo menos una ventana de observación para observar la zona de detección del medio de difusión capilar.

Los agentes reactivos utilizados en los procedimientos según la presente invención, que permiten la determinación del analito en la muestra líquida, son bien conocidos por el experto en la materia.  
60

El primer anticuerpo específico del analito, conjugado con un marcador visible y/o medible, se deposita en el estado seco en o sobre el medio de difusión capilar, pero es libre de migrar por difusión capilar en el estado húmedo.

65 El segundo anticuerpo específico del analito se inmoviliza de manera permanente en la zona de detección del medio de difusión capilar.

## ES 2 347 176 T3

Mediante la expresión “anticuerpo específico del analito” se entiende un anticuerpo capaz de unirse específicamente con el analito en una unión de tipo antígeno/anticuerpo. Se trata típicamente de un anticuerpo policlonal o monoclonal que tiene una fuerte afinidad para el analito. Preferentemente, se trata de un anticuerpo monoclonal.

5 El segundo anticuerpo específico del analito se inmoviliza en la zona de detección del medio de difusión capilar según unas técnicas conocidas por el experto en la materia. Este segundo anticuerpo se inmoviliza de tal manera que no sea móvil en el estado húmedo. Esta inmovilización se puede llevar a cabo por ejemplo mediante absorción o mediante un acoplamiento covalente.

10 El primer y el segundo anticuerpo se unen respectiva y específicamente con el analito, por ejemplo sobre dos sitios epitópicos, idénticos o diferentes del analito.

El primer y el segundo anticuerpo de los dispositivos de la presente invención permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo sándwich.

15 Además, los dispositivos según la presente invención comprenden el analito en sí, o un análogo del analito, inmovilizado en la zona de detección del medio de difusión capilar.

20 El analito, o el análogo del analito, se inmoviliza en la zona de detección del medio de difusión capilar según unas técnicas conocidas por el experto en la materia. El analito, o el análogo del analito, se inmoviliza de tal manera que no sea móvil en el estado húmedo. Esta inmovilización se puede llevar a cabo por ejemplo mediante absorción o mediante acoplamiento covalente.

25 Este segundo agente reactivo de la zona de detección es idéntico al analito en sí o un análogo apropiado del analito. Mediante la expresión “análogo apropiado del analito” se entiende cualquier entidad que se une de manera específica al primer agente reactivo de unión o anticuerpo específico del analito, en competición con el analito.

30 En un modo de realización, por un lado, el primer anticuerpo específico del analito, conjugado con un marcador visible y/o medible y, por otro lado, el analito, o el análogo del analito, inmovilizado en la zona de detección del medio de difusión capilar, permiten la detección del analito de la muestra líquida mediante un ensayo de competición. El depósito del segundo anticuerpo específico del analito se lleva a cabo corriente arriba del analito, o del análogo del analito, con relación a la dirección de difusión capilar.

35 El primer anticuerpo específico del analito, libre de migrar en el estado húmedo, se conjuga a un marcador visible y/o medible, que permite una medición o una observación directa del resultado del ensayo sándwich y del ensayo de competición. Cualquier marcador visible se puede observar directamente a simple vista cuando se concentra en la zona de detección del medio de difusión capilar. La medición del marcador se puede llevar a cabo directamente a simple vista o con la ayuda de un aparato de medición. Esta medición se lleva a cabo mediante una observación directa que no necesita ninguna manipulación suplementaria.

40 Ventajosamente, los dispositivos según la presente invención comprenden un primer anticuerpo específico del analito conjugado con un marcador visible y/o medible.

45 Los marcadores considerados según la presente invención permiten una detección directa a simple vista, o indirecta con la ayuda de un aparato, debido a la emisión de una señal, siendo dicha señal por ejemplo una fluorescencia, una coloración, una presencia de isótopo, una señal magnética.

50 Se citarán, por ejemplo, los marcadores particulares, coloreados o fluorescentes, constituidos por partículas de pequeño tamaño insolubles en agua y que forman por lo tanto unas suspensiones, dispersiones o soles, en fase líquida.

Los marcadores particulares son bien conocidos por el experto en la materia. Se conocen en particular los marcadores particulares coloreados o fluorescentes. A título de ejemplo, se citará el oro coloidal, las partículas de látex coloreadas, las partículas de látex fluorescentes y las partículas conjugadas con la avidina o con la estreptavidina.

55 Entre los marcadores que permiten una observación directa a simple vista, se citarán asimismo los marcadores de tipo dextrano (Hansen T.M., IVD Technology 4, 35-40, 2003). El agente reactivo de unión está entonces conjugado con una cadena de dextrano (derivado de polisacárido) que soporta unos fluoróforos.

60 Los agentes reactivos de unión están conjugados con el marcador visible y/o medible según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

65 En un modo de realización preferido de la invención, la zona de detección del medio de difusión capilar comprende un tercer agente reactivo dispuesto corriente abajo del segundo anticuerpo específico del analito, y corriente abajo del analito, o del análogo del analito, con relación a la dirección de difusión capilar. Este tercer agente reactivo permite disponer de un control positivo con el fin de asegurar la difusión efectiva capilar de la muestra líquida desde la zona de depósito hasta la zona de detección del medio de difusión capilar.

## ES 2 347 176 T3

Este tercer agente reactivo se inmoviliza de manera permanente en la zona de detección del medio de difusión capilar.

5 Puede tratarse, por ejemplo, de un anticuerpo que se une al primer anticuerpo específico del analito conjugado con el marcador. En este caso, este tercer agente reactivo permite verificar la migración del primer anticuerpo específico del analito conjugado con el marcador, hasta la zona de detección del medio de difusión capilar. Alternativamente, este tercer agente reactivo es independiente del analito y permite simplemente verificar la difusión de la muestra líquida hasta la zona de detección.

10 La invención se describe con mayor detalle haciendo referencia a las figuras siguientes:

### Figuras

15 Figura 1: Curva señal/concentración del analito para una dosificación inmunológica mediante un ensayo sándwich.

Figura 2: Curva señal/concentración del analito para una dosificación inmunológica mediante un ensayo de competición.

20 Figura 3: Dispositivo de dosificación simultánea de un analito mediante un ensayo según la presente invención.

Figura 4: Dispositivo de ensayo rápido según la presente invención, que comprende una cinta inmunocromatográfica en una caja.

25 Figura 5: Cinta inmunocromatográfica para la detección del hCG.

Figura 6: Resultado del ensayo según la figura 5 en caso de concentración baja en analito.

Figura 7: Resultado del ensayo según la figura 5 en caso de concentración alta en analito.

30 La figura 1 representa la curva señal/concentración obtenida para una dosificación inmunológica mediante ensayo sándwich. La curva obtenida es una curva de tipo curva de Gauss, que muestra que a una señal dada (S) corresponden dos concentraciones posibles del analito (C1 y C2), una baja (C1) y la otra elevada (C2) durante la lectura del resultado a un tiempo definido.

35 La figura 2 representa una curva señal/concentración para una dosificación mediante competición. Se observa la obtención de dos señales diferentes (S1 y S2) para dos concentraciones (C1 y C2) del analito a dosificar. Sin embargo, se observa una extinción de la señal a unas concentraciones relativamente poco elevadas de analito.

40 La figura 3 representa un dispositivo de dosificación simultánea de un analito según la presente invención, presentando la vista A) el dispositivo sin soporte de asido y la vista B) el dispositivo que comprende un soporte de asido.

La vista 3A) representa el dispositivo que comprende un medio de difusión capilar (1) que comprende en la dirección de difusión capilar (2):

- 45 a) una zona de depósito o de recepción de la muestra (3) sobre un primer material capilar 20;
- b) un primer anticuerpo específico del analito (4), conjugado con un marcador visible y/o medible, libre de migrar por difusión capilar en el estado húmedo en el medio de difusión capilar (1); este primer anticuerpo marcado se deposita, en el estado seco, sobre un segundo material capilar 21, en continuidad de flujo
- 50 c) una zona de detección del analito (5) que comprende sucesivamente, en la dirección de difusión capilar (2), por un lado, un segundo anticuerpo (6) específico del analito inmovilizado y, por otro lado, el analito, o un análogo del analito, inmovilizado (7); el segundo anticuerpo y el analito (o análogo del analito) están dispuestos o depositados sobre un tercer material capilar, en continuidad de flujo capilar con el segundo material capilar 21;
- 55

La vista B) representa el medio de difusión capilar (1) integrado en un soporte de asido (8) provisto de por lo menos una ventana de observación (9) que permite observar la zona de detección (5), y de una abertura 23 de recogida, depósito o recepción de la muestra líquida.

60

### Ejemplos

*Prueba de embarazo (detección en la orina de la hormona coriogonadotropina o hCG)*

65 La figura 4 representa la vista exterior de un ensayo rápido de tipo caja en el que se inserta una cinta cromatográfica según la presente invención.

## ES 2 347 176 T3

La cinta 1 contiene un anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -hCG 4 marcado con oro coloidal, depositado sobre fibra de vidrio 21 y deshidratado (conjugado). Este marcador particular es disuelto por la muestra líquida durante su depósito en el pocillo de muestras (S), y después entra en contacto sucesivamente, mediante migración sobre la cinta, con una primera zona que contiene un anticuerpo policlonal anti-hCG fijado (T1), una segunda zona que contiene el hCG fijado (T2) y una tercera zona que contiene un anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulina de ratón (C), véase la figura 5.

En caso de ausencia (o de concentración muy baja) de hormona hCG en la muestra depositada, no se producirá prácticamente ninguna reacción visible en la zona T1, mientras que aparecerá una línea en la zona T2 y en la zona C (figura 6). En caso de alta concentración en hCG en la muestra, la reacción en la zona T1 será muy baja o inexistente (debido al efecto “gancho” o “hook” descrito anteriormente); no se producirá ninguna reacción visible en la zona T2, puesto que, habiendo reaccionado casi la totalidad del anticuerpo anti  $\beta$ -hCG marcado con oro coloidal con el analito (hCG) de la muestra, ya no está disponible para reaccionar con el analito (o cualquier análogo del analito), y la zona C será positiva (figura 7).

Este sistema permite por lo tanto diferenciar efectivamente la interpretación del resultado en caso de baja concentración de analito (2 líneas positivas: T2+C) o de alta concentración de analito (1 línea positiva: C). Además, la aparición de las líneas se realizará en unos sitios diferentes (T1 o T2).

La tabla siguiente resume los resultados obtenidos en la zona de detección (T1, T2 y C) en función de la concentración en analito en la muestra con la ayuda de una lectura visual del ensayo.

TABLA 1

Resultados de la lectura visual del ensayo en función de la concentración en hCG en la muestra

Concentración en hCG (mIU/ml)		0	5	50	00	$\cdot 10^3$	$\cdot 10^4$	$0^5$	$\cdot 10^5$
Línea T1		/-		+	+	+	+	+	
Línea T2	+	+	+	+	+	+	+		
Línea C	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Además de una interpretación visual de los resultados, resulta muy posible realizar una lectura con la ayuda de un autómata, que es entonces capaz de proporcionar un resultado cuantitativo o semi-cuantitativo de la concentración del analito, sin dilución previa de la muestra y sin realizar gamas de concentración. En efecto, en función de la zona de concentración, los resultados obtenidos en la zona de detección son diferentes, y la interpretación de esta diferencia permite, después del calibrado o mediante observación visual, cuantificar las concentraciones del analito.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de determinación de un analito en una muestra líquida, que comprende:

- 5
- un medio de difusión capilar (1), mediante migración lateral que determina una dirección de referencia (2) de difusión capilar, que comprende una zona de depósito (3) de la muestra líquida, y una zona de detección (5) del analito, dispuesta corriente abajo de dicha zona de depósito (3),
  - 10 - un primer agente reactivo (4) de unión específica del analito, conjugado con un marcador visible y/o medible, libre de migrar en el estado húmedo, por difusión capilar, en el medio de difusión capilar (1), según la dirección de referencia, estando la zona de disposición del primer agente reactivo de unión confundida con la zona de depósito (3) de la muestra, o estando dispuesta corriente abajo de esta última, pero corriente arriba de la zona de detección (5),
  - 15 - un segundo agente reactivo (6) de unión específica del analito, inmovilizado en la zona de detección (5),

20 **caracterizado** porque la zona de detección (5) comprende un tercer agente reactivo constituido por el analito (7), o un análogo del analito, inmovilizado, y dispuesto a distancia del segundo agente reactivo (6) de unión específica, corriente abajo de éste.

2. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende un órgano de captación de la muestra líquida independiente del medio de difusión capilar, susceptible de ser llevado en contacto con la zona de depósito, para un flujo de dicha muestra en dicha zona de depósito.

25 3. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el medio de difusión capilar (1) comprende una zona de disposición del primer agente reactivo (4) de unión, en el estado seco y libre, en o sobre dicho medio de difusión capilar.

30 4. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el segundo agente reactivo (6) de unión específica, y/o el analito (7), o el análogo del analito, están dispuestos sobre el medio de difusión capilar según una línea transversal a la dirección de referencia.

35 5. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el medio de difusión capilar comprende una zona de control (C), corriente abajo de la zona de detección (5).

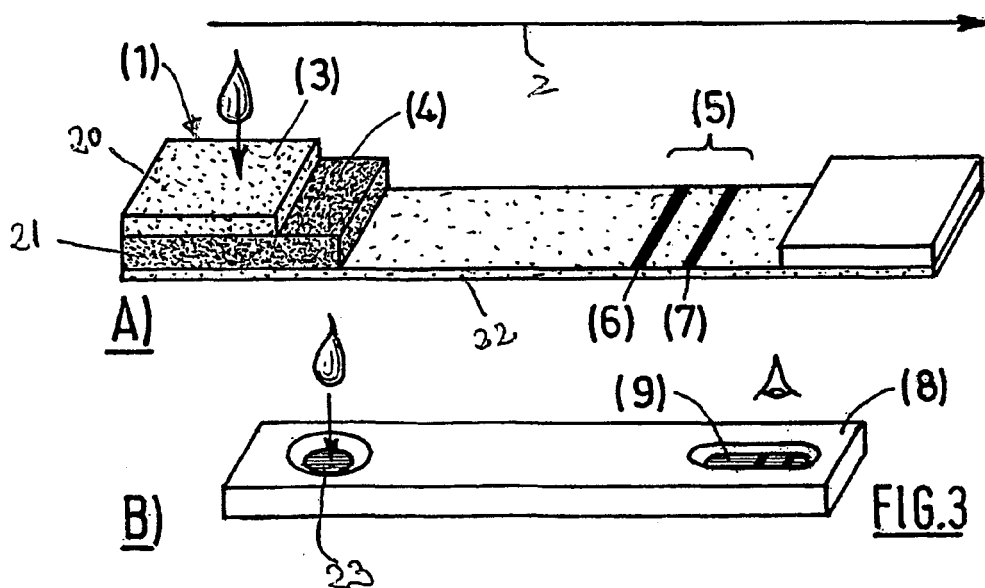
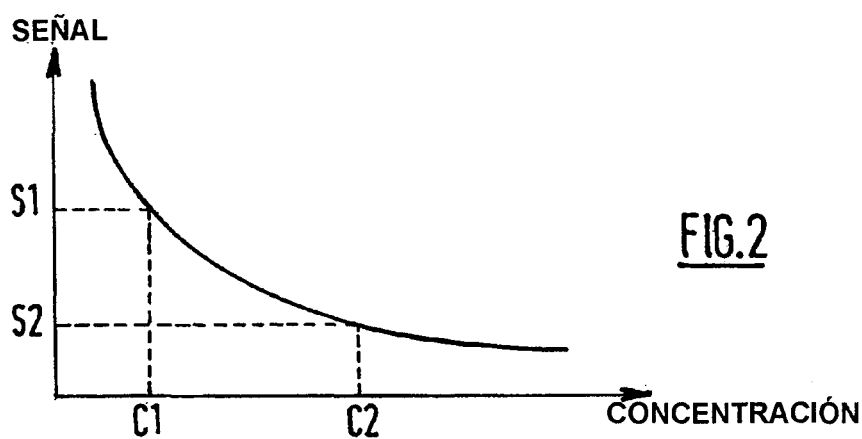
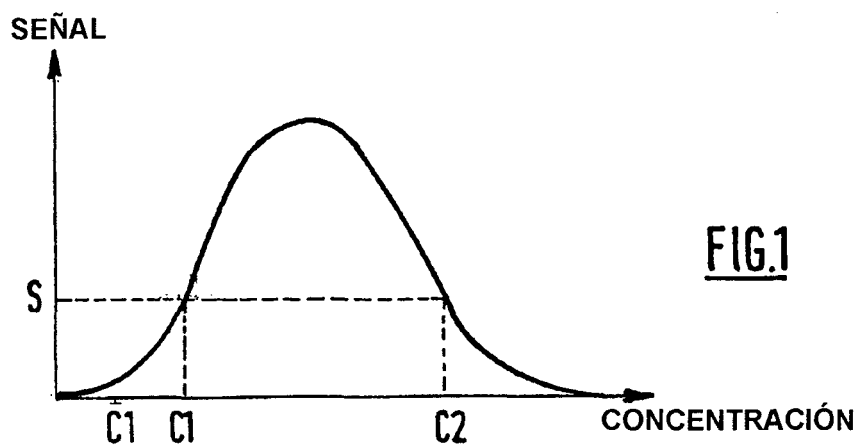
6. Procedimiento de determinación de un analito en una muestra líquida mediante la utilización de un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque:

- 40
- se deposita una muestra líquida en la zona de depósito (3) del medio de difusión capilar (1),
  - se espera un tiempo suficiente para la migración por difusión capilar de la muestra líquida hasta la zona de detección (5),
  - 45 - se observa en la zona de detección (5) la medición en la que, por un lado, el primer agente reactivo (4) de unión específica complejo con el analito se fija al segundo agente reactivo (6) de unión específica, obteniendo una primera señal y, por otro lado, el primer agente reactivo (4) de unión no complejo se fija al tercer agente reactivo constituido por el analito (7) o un análogo del analito, obteniendo una segunda señal,
  - 50 - se determina el analito a partir de las primera y segunda señales.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la cantidad del primer agente reactivo (4) de unión es excedentaria con relación a la cantidad del analito presente en la muestra líquida, o del número de sitios de complejación presentes en dicha muestra líquida.

55 8. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque una concentración baja en analito se detecta mediante la ausencia de la primera señal y la presencia de la segunda señal.

60 9. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque una concentración importante en analito se detecta mediante la ausencia de las dos señales.



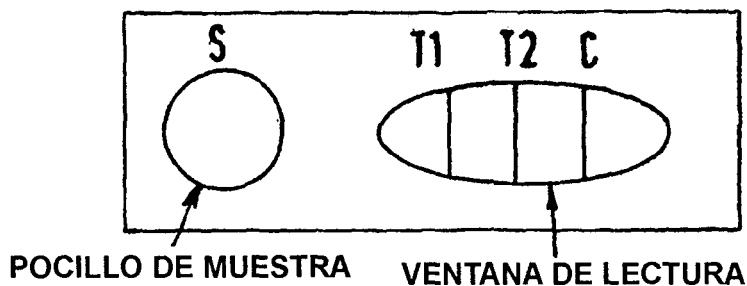
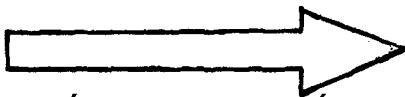
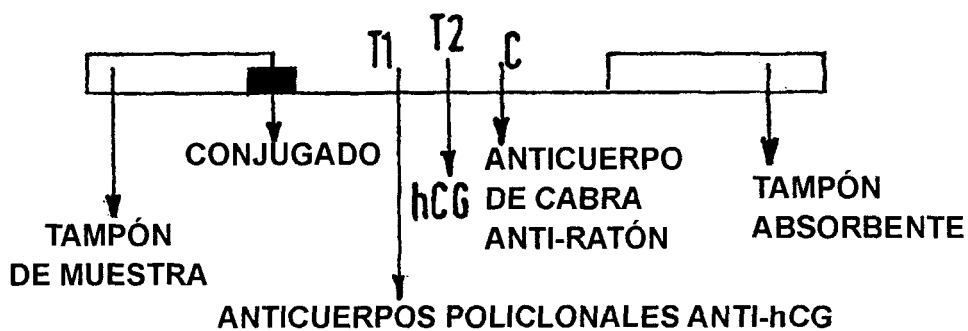


FIG.4



DIRECCIÓN DE LA DIFUSIÓN CAPILAR

FIG.5

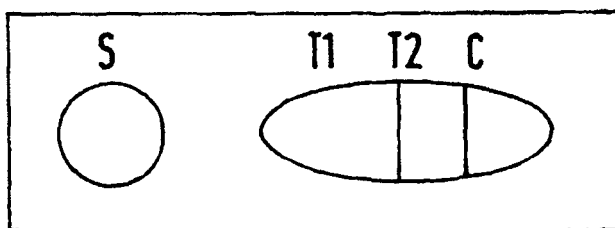


FIG.6

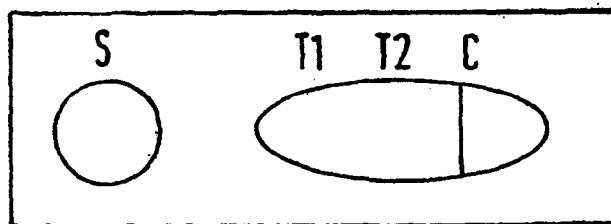


FIG.7