



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 696**

(51) Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

C12M 1/40 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02022910 .0**

(96) Fecha de presentación : **10.10.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1369473**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

(54) Título: **Módulo de casete automatizado para un aparato para llevar a cabo inmunoensayos y uso del mismo.**

(30) Prioridad: **07.06.2002 US 387287 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.06.2009

(73) Titular/es: **CHOLESTECH CORPORATION**
3347 Investment Boulevard
Hayward, California 94545-3808, US

(72) Inventor/es: **Nugent, Anthony;**
Cowley, Leanne;
Bellet, Neal;
Shindelman, Jeffrey;
Leos, Michael;
Worthy, Thomas y
Haley, Kimberly

(74) Agente: **Miazzetto, Fabrizio**

ES 2 321 696 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

Módulo de casete automatizado para un aparato para llevar a cabo inmunoensayos y uso del mismo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está dirigida a un aparato y a un procedimiento para ser usados en el ensayo de una muestra de fluido corporal para un analito seleccionado y, particularmente, para su uso en ensayos automatizados multietapas.

10 **Antecedentes de la invención**

En vistas a los antecedentes de la invención, se hace referencia a De Maat, M.P.M. *et al.*, Fibrinolysis 8 (Suppl. 2):50-52 (1994); Grau, A.J. *et al.*, "Clinical and Biochemical Analysis in Infection-Associated Stroke". Stroke 26 (9):1520-6 (Sept. 1995); Harlow, E. *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab (1988);
15 Hewett, G.E., Patente US nº 5.110.724 (1992); Hewett, G.E. *et al.*, Patente US nº 5.171.688 (1992); Kuller, L.H. *et al.*, Am. J. Epidemiol. 144:537-547 (15 Sept. 1996). Leuversing *et al.*, Patente US nº 4.313.734 (1982); Liuzzo G, M.D. *et al.*, N. Engl. J. Med. 331(7): 417-424, 18 Ago. 1994; Mendall, M.A. *et al.*, British Med. J. 312:1061-65 (27 Abr. 1996); Thompson, S.G. *et al.*, N. Engl. J. Med. 1995; 332:635-41; Tracy, R.P. *et al.*, Circulation, 1996, V93, N3 (1 Feb.), P8 (Tracy).

20 Se conocen ensayos para detectar la presencia y los niveles de una variedad de analitos en muestras de fluido corporal. Tales ensayos a menudo están diseñados con el fin de simplificar el uso para que se puedan llevar a cabo fiablemente en una consulta médica o en otro entorno clínico donde el personal puede tener poca práctica en el procedimiento de un ensayo clínico o en la interpretación de los resultados de un ensayo. Para minimizar la necesidad
25 de participación de un operador, es preferible que el ensayo se lleve a cabo de manera automatizada o independiente.

Para simplificar el funcionamiento, tales ensayos independientes se han limitado típicamente a procedimientos de ensayo de una sola etapa. Un número de ensayos útiles, sin embargo, son multietapas por naturaleza, necesitando más de una etapa de reacción o de unión. Además, una o más de las etapas pueden limitar la velocidad o pueden ser
30 afectadas por concentraciones de reactivos localizados. Típicamente, los ensayos multietapas se automatizan menos fácilmente y necesitan generalmente más aportación del usuario, aumentando así la posibilidad de errores.

La solicitud de Patente Europea 02004339.4 con título "High density lipoprotein assay device and method" divulga un casete para medir la concentración de colesterol asociado con HDL en muestras de fluido sanguíneo. Por razones
35 de efectividad y simplicidad, el diseño de ensayo es tal que la eliminación de lipoproteínas no HDL de una muestra de colesterol de HDL en la muestra ocurre sin interrupción del ensayo. De esta manera, el flujo de muestra así como el contacto de reactivo con el mismo no se pueden controlar generando interferencia en la prueba cuantitativa y cualitativa.

40 El documento US 5.744.096 también asignado al solicitante de la presente solicitud divulga un casete de inmunoensayo útil para llevar a cabo inmunoensayos multietapas de manera automatizada. El casete puede adoptar diferentes posiciones operativas en las que se transfieren soluciones a través de un camino absorbente que contiene reactivos de ensayo. Para este fin, el casete contiene un cuerpo y un miembro de soporte, este miembro de soporte puede empujarse hacia el miembro de base para establecer un contacto entre dos medios de reacción. La US '096 también divulga
45 un aparato para mover automáticamente dicho miembro de soporte y de base el uno hacia al otro para establecer un contacto entre una tira de transferencia proporcionada en el miembro de base y una zona de reacción de control proporcionada en el miembro de soporte. Sin embargo, el aparato no mueve repetidamente el miembro de soporte y de base hacia delante y atrás entre sí para permitir un control de la velocidad de transferencia de muestra.

50 Es por tanto el problema de la presente invención proporcionar un dispositivo de ensayo independiente automatizado que sea capaz de llevar a cabo ensayos multietapas, en particular aquellos que contienen etapas de reacción o de unión múltiples en los que una o más de las etapas limitan la velocidad o se afecta al resultado del ensayo final por concentraciones de reactivo de analito localizadas.

55 **Resumen de la invención**

Los problemas anteriores se resuelven mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y un aparato de acuerdo con la reivindicación 6.

60 A continuación se describe un casete para el uso en la detección de un analito en una muestra de fluido corporal líquida. El casete proporciona un cuerpo de casete que tiene preferiblemente un pocillo de muestra para recibir la muestra, un soporte montado en el cuerpo para el movimiento hacia delante y atrás de una posición de transferencia, y un depósito de reactivo y una tira de reactivo llevados por el cuerpo y el soporte, respectivamente. El depósito de reactivo contiene una primera composición de reactivo capaz de reaccionar con uno o más componentes de muestra
65 para formar una muestra modificada cuando la muestra migra desde el pocillo de muestra hasta el interior del depósito. La tira de reactivo contiene una segunda composición de reactivo capaz de reaccionar con la muestra modificada para formar un producto detectable dependiente del analito. En un modo de realización, la tira de reactivo tiene una zona de transferencia que se pone en contacto con el depósito cuando el soporte se mueve a su posición de transferencia y una

zona de detección situada hacia abajo de la zona de transferencia. Controlando el movimiento del soporte hacia delante y atrás de su posición de transferencia, se pueden controlar el volumen y la velocidad del flujo de muestra desde el depósito hasta la tira optimizando y/o estandarizando así las condiciones de transferencia-muestra en el ensayo.

Para la detección de un analito plurivalente en una muestra de fluido corporal líquida, la primera composición de reactivo en el depósito de reactivo puede incluir un conjugado no soportado de un anticuerpo antianalito y un grupo indicador detectable donde la reacción para formar una muestra modificada incluye la unión del conjugado con el analito de muestra para formar un complejo de analito y conjugado. La segunda composición de reactivo en la tira de reactivo puede incluir un anticuerpo antianalito soportado en una región de detección de la tira de reactivo ubicada hacia abajo de la región de transferencia de muestra de la tira donde la reacción para formar un producto detectable dependiente del analito incluye la unión de complejo con el anticuerpo soportado para localizar el indicador detectable en el complejo en la zona de detección. El conjugado no soportado en este modo de realización puede ser un conjugado de un anticuerpo antianalito y un indicador visible, como partículas metálicas, partículas marcadas con restos de color o fluorescentes, polímeros marcados con restos de color o fluorescentes, partículas, o moléculas de color o fluorescentes.

Para el uso en la detección de analitos de proteínas C-reativas en una muestra sanguínea, el anticuerpo antianalito en el conjugado no soportado en el depósito de reactivo y el anticuerpo antianalito soportado en la tira de reactivo pueden ser anticuerpos específicos contra un epítipo común en una proteína C-reativa. Alternativamente, los dos anticuerpos se pueden dirigir contra diferentes epítipos de proteínas C-reativas.

El soporte comprende preferentemente una ventana a través de la cual se puede ver la unión del complejo en la zona de detección en la tira de reactivo. Además, la zona de detección en la tira de reactivo puede estar cubierta por una película reflectora en la superficie de la tira orientada hacia el otro lado de la ventana.

El casete comprende además preferentemente un depósito de absorción llevado por el soporte, hacia abajo de dicha zona de detección, para recibir líquido de muestra transferida a través de la tira de reactivo.

La invención comprende un aparato para el uso en la detección de un analito en una muestra de fluido corporal líquida de acuerdo con la reivindicación 6. El aparato comprende un casete del tipo descrito anteriormente y un instrumento para manejar el casete. El instrumento tiene (a) una carcasa de casete en la que se pone de forma desmontable el casete durante un ensayo de muestra, (b) un actuador manejable para mover el soporte en el casete hacia delante y atrás de su posición de transferencia de muestra, (c) un detector manejable para detectar una reacción específica para un analito en la zona de detección en la tira de reactivo, y (d) un procesador manejablemente conectado con el actuador para controlar la regulación de volumen y la velocidad de movimiento de material de muestra desde el depósito de reactivo hasta la tira de reactivo.

En un modo de realización preferido, la zona de detección en la tira de reactivo en el casete está cubierta por una película reflectora en la superficie de la tira orientada hacia el otro lado de dicha ventana de manera que el flujo de líquido de muestra a través de la zona de detección produzca un primer cambio en la reflectancia mensurable a través de la ventana, y la presencia de una reacción dependiente del analito en la zona de detección produzca un segundo cambio en la reflectancia mensurable a través de la ventana. El detector puede ser manejable para detectar flujo de líquido a través de la zona de detección por un primer cambio de la reflectancia óptica medida y es manejable para medir una reacción subsiguiente dependiente del analito en la zona de detección por un segundo cambio de la reflectancia óptica medida.

La unidad de control puede ser manejable para controlar el volumen y la velocidad de la transferencia de muestra desde el depósito de reactivo hasta la tira de reactivo controlando uno o más de (i) el período de incubación de muestra antes de transferir primero la muestra desde el depósito hasta la tira de reactivo, (ii) la frecuencia de ciclos con la que el actuador mueve el soporte hacia delante y atrás de su posición de transferencia, (iii) el tiempo de contacto que se mantiene el soporte en su posición de transferencia durante cada ciclo, y (iv) el número total de ciclos de transferencia. La unidad es manejable para controlar el volumen y la velocidad de la transferencia de muestra desde dicho depósito hasta la tira de reactivo controlando (i) la frecuencia de ciclos con la cual el actuador mueve el soporte hacia delante y atrás de su posición de transferencia y (ii) el tiempo de contacto que se mantiene el soporte en su posición de transferencia durante cada ciclo.

La invención comprende un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para llevar a cabo un ensayo para un analito de fluido corporal por las etapas de: (a) introducir un fluido corporal que contenga el analito en un depósito de absorción que contenga una primera composición de reactivo capaz de reaccionar con uno o más componentes de muestra formando así una muestra modificada, (b) poner en contacto repetidamente el depósito, con dicho contenido de muestra de fluido corporal absorbida, con una almohadilla de reactivo de absorción que contenga una segunda composición de reactivo capaz de reaccionar con la muestra modificada formada en el depósito para producir un producto detectable dependiente del analito, y (c) controlar la frecuencia y la duración de dicho contacto controlando así el volumen y la velocidad de transferencia del fluido de muestra desde el depósito hasta la almohadilla.

En un modo de realización generalmente preferido de la presente invención, la almohadilla de reactivo es una tira de reactivo alargada que tiene una zona de transferencia de muestra en la que el depósito entra en contacto con la tira y una zona de detección situada hacia abajo de la zona de transferencia.

Para detectar un analito plurivalente en una muestra de fluido corporal líquida, como una proteína C-reactiva en una muestra sanguínea o de suero, la primera composición de reactivo en el depósito de reactivo puede incluir un conjugado no soportado de un anticuerpo antianalito y un grupo indicador detectable, y la composición de reactivo en la tira de reactivo, un anticuerpo antianalito soportado en una región de detección en la tira de reactivo.

Éstos y otros objetos y características de la invención quedarán más plenamente aparentes cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención en conjunción con las figuras que acompañan.

Breve descripción de las figuras

Las Figs. 1A y 1B son vistas en plano de un casete de inmunoensayo construido de acuerdo con un modo de realización de la invención, con el casete en una posición de carga de muestra inicial (Fig. 1A) y en una posición de transferencia de muestra (Fig. 1B);

La Fig. 2 es una vista de sección ampliada del soporte de casete en la región de la zona de detección;

Las Figs. 3A y 3B ilustran la distribución de fluido de muestra antes (Fig. 3A) y después (Fig. 3B) de la transferencia de fluido de muestra en el casete.

La Fig. 4 es una vista en perspectiva de un instrumento para manejar el casete construido de acuerdo con un modo de realización de la invención;

La Fig. 5 ilustra varios componentes funcionales del instrumento para manejar el casete en relación con un casete de inmunoensayo de la invención;

Las Figs. 6A y 6B ilustran perfiles de transferencia de volumen de muestra diferentes alcanzables con la invención;

La Fig. 7 ilustra perfiles de reflectancia de un analito de proteína C-reactiva a tres concentraciones diferentes durante un procedimiento de ensayo de acuerdo con un modo de realización de la invención; y

La Fig. 8 es un diagrama de reflectancia medida como función de concentración de analito de proteína C-reactiva creado de acuerdo con la invención.

Descripción detallada de la invención

I. Casete de Inmunoensayo

Las Figs. 1A y 1B muestran un casete de inmunoensayo 10 construido de acuerdo con un modo de realización de la invención. El casete contiene dos miembros en forma de chapa, un miembro de base o cuerpo 12 y un soporte o miembro de soporte 14 que se pueden fabricar por procedimientos estándares moldeadores o mecanizados. El soporte 14 está montado en el cuerpo 12 para moverse en una dirección vertical en las figuras desde una posición de reposo ilustrada en la Fig. 1A hasta una posición de transferencia de muestra mostrada en la Fig. 1B. Más particularmente, el soporte 14 está montado para moverse hacia delante y atrás de una posición desde transferencia de muestra.

La estructura que monta el soporte 14 en el cuerpo 12 puede ser de bloques compresibles, como bloques elásticos, como se ilustra por 16, que sostienen los extremos opuestos del soporte 14. Estos bloques 16 se comprimen cuando el soporte 14 se mueve desde su posición de reposo, en la que los bloques 16 están sustancialmente sin compresión, hasta la posición de transferencia de muestra, en la que los bloques 16 están a compresión máxima. Se notará que se podría montar el soporte 14 en el cuerpo 12 de casete por una variedad de estructuras compresibles, como muelles o imanes, con el fin de obtener movimientos transversales hacia delante y atrás desde la posición de transferencia de muestra.

En el cuerpo 12 se proporciona un pocillo de muestra 18 para recibir la muestra de fluido corporal a analizar. El pocillo 18 está diseñado para recibir una muestra de fluido corporal, como una muestra de suero o de sangre, que tiene típicamente un volumen entre 20 y unos 60 μl . El pocillo de muestra 8 transfiere muestra a una almohadilla central 20. La almohadilla central 20, a su vez, se comunica por una mecha de capilares 22, a la que también nos referiremos en la presente como capa de extensión, con una almohadilla de reactivo o un depósito 24 que contiene un primer reactivo o composición de reactivo que queda por describir. Cuando se pone líquido de muestra en el pocillo 18, migra por capilaridad a través de la almohadilla central 20 y desde la almohadilla central 20 a través de la capa de extensión 22 al depósito 24. Cuando la muestra que se está analizando es una muestra sanguínea, uno o más de los elementos en el camino de flujo entre el pocillo de muestra 18 y el depósito 24, y típicamente la almohadilla central 20 y/o la capa de extensión 22, pueden servir para quitar o retardar el flujo de glóbulos rojos, con lo que el material de muestra que llega al depósito se ha deliberado de células sanguíneas u otros componentes corpusculares. El material de fibra de vidrio y otro material de matriz apropiado para este propósito son bien conocidos.

Alternativamente, o adicionalmente, uno o más de los elementos en el camino de flujo pueden ser eficaces para quitar componentes de muestra no deseados mediante el uso de reactivos de unión soportados, por ejemplo, anticuerpos,

ES 2 321 696 T3

específicos contra los componentes no deseados. Los componentes de muestra no deseados se pueden quitar también exponiendo la muestra en el camino de flujo a un agente precipitante eficaz para precipitar de manera selectiva los componentes de muestra no deseados. Por ejemplo, se puede usar sulfato de dextrano para precipitar selectivamente determinadas lipoproteínas en una muestra sanguínea. O bien se bloquea la migración de las partículas precipitadas a través del camino de flujo, o bien se retarda su flujo. La almohadilla central 20, la tira de transferencia de muestra 22 y el depósito 24 están formados preferiblemente por un material fibroso y altamente absorbente capaz de sacar fluido vía flujo capilar. Una variedad de materiales fibrosos, como los que se usan habitualmente para esteras filtrantes fibrosas, incluyendo celulosa, acetato de celulosa y matrices de fibra de vidrio, son materiales apropiados para la tira de transferencia. Las fibras pueden ser reticuladas, si se desea, por reticulación química, fusión térmica o similares. Los sustratos porosos también son apropiados, como el vidrio aglomerado, las perlas fusionadas de polímero y similares, cuyas mojabilidad y dimensiones de intersticios son tales que promueven el movimiento de un medio acuoso en la tira humedeciendo la superficie. Un material a título de ejemplo es un filtro de fibra de vidrio que tiene una densidad de relleno de 0,2-0,5 gm/cm³ aproximadamente. El vidrio central 20, la capa de extensión 22 y el depósito 24 se pueden montar en el cuerpo 12 directamente en el cuerpo o mediante un respaldo hecho de plástico u otro material inerte de soporte.

Aunque el modo de realización del casete 10 mostrado está diseñado para un ensayo único, en el lado derecho del casete en las figuras, se notará que el casete se podría adaptar para ensayo(s) adicional(es) en el lado izquierdo del casete. Además, el ensayo adicional puede tener el mismo formato de flujo de fluido o puede tener un formato diferente, por ejemplo, la almohadilla central 20 puede comunicarse con una tira de reactivo alargada que se extiende a lo largo de la región de borde izquierdo superior del cuerpo de casete.

Para completar la descripción del cuerpo de casete 12, un par de bloques elastoméricos 26 a ambos lados de la almohadilla central sirven para proteger y limitar el movimiento del soporte cuando éste se mueve hacia su posición de transferencia de muestra.

El soporte 14 tiene un par de barras de reacción alargadas, como la barra 28, que extienden hacia el exterior desde el centro del soporte como se ilustra en las Figs. 1A y 1B. Una tira de reactivo alargada 30 está fijada a, y se extiende por, la superficie inferior orientada hacia adentro del soporte 14 como se muestra. La tira tiene una zona de transferencia de muestra 32 hacia arriba y una zona de detección 34 hacia abajo ubicada directamente debajo de una ventana 36 formada en la barra de soporte. Como se ilustra en la Fig. 1B, el movimiento del soporte 14 a su posición de transferencia de muestra, con la compresión de los bloques 16, deja la zona de transferencia de muestra 32 entrar en contacto con el depósito de reactivo 24 en el conjunto de casete 12 promoviendo un flujo capilar de fluido desde el depósito 24 hasta la tira de reactivo 30.

La tira de reactivo 30 está formada de un material poroso o fibroso que promueve un flujo capilar a través suyo. Los materiales preferidos incluyen membranas porosas de polímero fusionado o de polímero microporoso, como las membranas microporosas de polisulfona, polipropileno, nailon, nitrocelulosa, TeflónTM o cloruro de polivinilo. En el presente caso, se prefiere particularmente la nitrocelulosa tal como está disponible de Sartorius, teniendo dimensiones de longitud, anchura y espesor de entre 5-20 mm, 1-5 mm y 0,1-0,5 mm, respectivamente.

El extremo hacia abajo de la tira 30 está en contacto con una almohadilla absorbente 38 que funciona como un depósito para sacar líquido de muestra suministrado a la tira 30 en la zona de transferencia de muestra y fluye en una dirección hacia abajo (a la derecha en las figuras) hacia el interior y a través de la zona de detección 34. La almohadilla 38 está hecha de un material absorbente apropiado, como vidrio fibroso o celulosa. El volumen de absorción de la almohadilla 38 es, preferentemente, por lo menos la mitad del volumen de la muestra añadida, por ejemplo, 10 a 30 μ l.

En el camino de fluido definido por la tira de reactivo 30 están dispuestos reactivos, que se describirán posteriormente, eficaces para producir un producto de reacción detectable dependiente del analito, que se detecta en la zona de detección. Por lo tanto, se pueden llevar a cabo varios ensayos usando el casete 10 como se describirá posteriormente.

La superficie orientada al exterior de la tira de reactivo 30, hacia abajo de la zona de transferencia de muestra 32, está cubierta por una película reflectora impermeable, como una película Mylar. En particular, la película se extiende por la zona de detección 34 en la tira de reactivo 30 que está interpuesta entre la ventana de soporte 36 y la película reflectora. El objetivo de la tira reflectora es mejorar la reflectividad de la tira de reactivo 30, tal como se ve por la ventana de soporte 36 y, en particular, mejorar el cambio de reflectividad que se observa cuando se humedece la tira 30 y en respuesta a una reacción analito específico que tiene lugar en la zona de detección 34, como se comentará más adelante.

La construcción de las varias capas en el soporte 14 se ilustra en la vista despiezada de la Fig. 2. Ahí se ven la barra de soporte 28 con la ventana 36 ubicada en su interior, y la tira de reactivo 30 con la zona de transferencia de muestra 32 hacia arriba y la zona de detección 34. La tira 30 está atada a la barra de soporte 28 con una tira adhesiva bilateral 44 que está inicialmente recubierta con un respaldo desmontable 45. Como se muestra, la tira adhesiva 44 está separada por un espacio que corresponde a la ventana de soporte 36 y la zona de detección 34. La almohadilla absorbente 38 está posicionada de manera que se traslapa con el extremo hacia abajo de la tira de reactivo 30, y la película reflectora está posicionada de manera que se extiende desde un punto justo hacia abajo de la región de transferencia de muestra en la tira 30 hasta un punto más allá de la almohadilla absorbente 38. En construcción, los componentes anteriores

están situados como se muestra, y están atados a la barra de soporte 28 y entre sí quitando el respaldo adhesivo 44 y apretando firmemente la cara adhesiva del conjunto contra la barra de soporte 28.

El casete 10 está diseñado particularmente para un ensayo de analito en el que (i) componentes de muestra que típicamente incluyen el analito mismo, reaccionan con uno o más reactivos en el depósito 24 para formar una muestra modificada, y (ii) la muestra modificada, típicamente analito modificado, reacciona con una segunda composición de reactivo para producir un producto detectable dependiente del analito. Es decir, tanto el depósito de reactivo 24 como la tira de reactivo 30 en este modo de realización preferido contienen uno o más reactivos para llevar a cabo estas reacciones. El o los reactivos del depósito 24 y la tira 30 también se mencionan aquí como una primera y segunda composiciones de reactivo, respectivamente, y pueden incluir uno o más enzimas, anticuerpos, anticuerpos marcados o sustratos de enzima, reactivos de unión y/o agentes precipitantes tal como se comentará más adelante.

En un casete 10 a título de ejemplo, para la detección de un analito antígeno plurivalente, la composición de reactivo en el depósito 24 incluye un anticuerpo de analito específico no soportado marcado, por ejemplo, covalentemente con un indicador detectable, por ejemplo, partículas metálicas, moléculas fluorescentes o de color, polímeros ramificados conteniendo restos acoplados fluorescentes o de color y partículas recubiertas, por ejemplo, partículas de látex con un recubrimiento fluorescente. “No soportado” significa que el reactivo está libremente móvil en el interior del depósito 24. Por tanto, cuando se añade analito al depósito 24, éste reacciona específicamente con el reactivo de anticuerpo para formar un complejo marcado móvil de analito y anticuerpo. En otros modos de realización preferidos de la presente invención, las composiciones de reactivo pueden ser soportadas o no soportadas, dependiendo de si el reactivo tiene que migrar junto con el analito y/o si se esperaría que el reactivo interfiriera con la determinación de analito final.

Se conocen en el ramo procedimientos para marcar un reactivo de unión, como anticuerpos marcados, incluyendo el uso de marcaciones radioactivas, marcaciones fluorescentes o enzimas unidos que convierten un sustrato separado en una especie detectable. Una variedad de anticuerpos marcados con indicadores, como anticuerpos marcados con enzimas, están disponibles en el mercado o se pueden preparar fácilmente según procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Harlow, pp. 319-358). Para usar con el presente casete de inmunoensayo 10, se prefieren procedimientos de marcación detectables ópticamente. Con este propósito se usan ampliamente enzimas que reaccionan con un sustrato para producir un producto de reacción visible. Un reactivo marcado particularmente preferido es un anticuerpo de analito específico conjugado a una partícula visible, como una perla de látex de color o de oro coloidal. Tales conjugados se describen en la Patente US nº 4.313.734 (Leuving) y se pueden obtener también de fabricantes como BB International (Cardiff, UK) y NanoProbes (Stony Brook, NY).

La composición de reactivo en la tira de reactivo 30, que puede incluir uno o más reactivos, puede estar repartida por toda la tira 30 o localizada en la tira 30, por ejemplo, en la zona de transferencia de muestra 32 justo hacia abajo de la zona de transferencia 32, o en la zona de detección 34, de forma soportada o no soportada. En el modo de realización descrito anteriormente, para detectar un analito plurivalente, la segunda composición de reactivo incluye un anticuerpo antianalito soportado en la zona de detección 34. En este formato, el complejo de analito y anticuerpo marcado transferido desde el depósito 24 hasta la tira de reactivo 30 migra en una dirección hacia abajo por la tira 30, donde es atrapado en la zona de detección 34. La etapa para formar un producto de reacción detectable incluye atrapar un complejo detectable en la zona de detección 34.

En otros modos de realización preferidos, la segunda composición de reactivo puede incluir enzimas soportados o no soportados, sustratos, reactivos de unión marcados, agentes fotosensibilizadores, agentes reductores u oxidantes y/o grupos de ácido o de base que pueden donar proteínas e iones hidroxilos como parte de una reacción de detección de analito, según procedimientos de reacción conocidos de dos etapas donde, en la presente invención, una de las etapas debe llevarse a cabo en el depósito de reactivo 24 y la segunda en la tira de reactivo 30.

Más específicamente, la zona de detección 34 puede contener reactivos eficaces para producir un producto de reacción detectable con un complejo de analito y anticuerpo no marcado. Por ejemplo, la zona de detección 34 puede contener una oxidasa, una peroxidasa y un compuesto que se puede oxidar a una especie detectable como un colorante. Cuando el complejo de analito y anticuerpo incluye un sustrato para la oxidasa, el H_2O_2 generado en la reacción resultante reacciona con el compuesto oxidable, catalizado por la peroxidasa, para generar el colorante detectable. Tales ensayos están descritos, por ejemplo, en Hewett *et al.*

Los reactivos se pueden incorporar en el depósito 24 y en la tira 30 empapando el depósito o el material de tira en una solución de los reactivos, secando o añadiendo después una solución del material de reactivo a toda o a una zona localizada de la tira 30, secando posteriormente. Donde el reactivo está soportado, el depósito o la región de tira pueden proporcionar por naturaleza, o estar modificados químicamente según métodos conocidos para tener grupos de superficie reactivos, como grupos amino, carboxilo, sulfhídrico o aldehído que permiten un acoplamiento covalente usando agentes activadores o agentes de acoplamiento bifuncionales.

En un modo de realización particularmente preferido, el casete 10 está diseñado para la detección de proteína C-reactiva, típicamente medida en una muestra sanguínea o de suero. En este modo de realización, la composición de reactivo en el depósito 24 es un anticuerpo monoclonal no soportado específico contra un epítipo de proteína C-reactiva, es decir, un epítipo en una de las 5 subunidades idénticas en proteína C-reactiva. Un anticuerpo de proteína

anti C-reactivo a título de ejemplo es un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular identificada por el número CC002, y disponible por Scripps Laboratories (San Diego, CA). El anticuerpo está marcado por conjugación a micropartículas de oro, según métodos estándares, por ejemplo, como se describe en, “*The place of gold in rapid tests*”, John Chandler, Tracey Gurmin y Nicola Robinson, IVD Technology 6, n° 2 (2000): 37-49. El segundo reactivo es un anticuerpo específico contra la proteína C-reactiva y está soportado en la zona de detección 34. Un anticuerpo a título de ejemplo es el mismo que el que se usa en el primer reactivo de anticuerpo (de depósito). Se dan detalles del ensayo en el Ejemplo 1.

Las Figs. 3A y 3B ilustran el flujo de líquido de muestra hasta el interior y a través de los elementos de flujo de fluido del casete 10 durante el funcionamiento del casete. Como se ve en la Fig. 3A, la muestra líquida aplicada al pocillo de muestra 18 se saca por capilaridad hasta la almohadilla central 20 y, desde ahí, por la capa de extensión 22 al depósito 24. Aquí, la muestra puede ser detenida durante un tiempo de incubación deseado, en presencia del primer reactivo. Tiempos de incubación típicos pueden variar de unos pocos segundos hasta diez minutos o más.

Cuando el soporte 14 en el casete 10 se mueve a su posición de transferencia de muestra, mostrada en la Fig. 3B, el líquido de muestra fluye por capilaridad hasta el interior de la zona de transferencia de la tira 32 cuando esta última entra en contacto con el depósito 24. Desde la zona de transferencia 32, el líquido de muestra migra en una dirección hacia abajo hasta el interior y a través de la zona de detección 34 y finalmente hasta el interior de la almohadilla absorbente 38. Controlando la demora entre la adición de material de muestra en el pocillo de muestra 18 del casete y el movimiento inicial del soporte 14 hasta su posición de transferencia de muestra, el casete 10 se puede manejar para controlar el periodo de incubación de muestra antes que la muestra se transfiera primeramente desde el depósito 24 hasta la tira de reactivo 30.

Adicionalmente, la velocidad de la transferencia de líquido y el volumen de muestra total transferido se pueden controlar controlando (i) la frecuencia de ciclo con la cual el actuador mueve el soporte 14 hacia delante y atrás de su posición de transferencia, (ii) el tiempo de contacto que se mantiene el soporte 14 en su posición de transferencia durante cada ciclo, y (iii) el número total de ciclos de transferencia. Como se comenta en la siguiente sección, este control está convenientemente proporcionado por un instrumento para manejar el casete en un aparato de ensayo construido de acuerdo con otro aspecto de la invención.

II. Instrumento para manejar el casete

La Fig. 4 es una vista en perspectiva de un instrumento para manejar el casete 48 construido de acuerdo con la invención, y la Fig. 5 muestra elementos funcionales clave del instrumento en forma esquemática. El instrumento incluye una carcasa de casete, representada por el cajón 50, adaptada para recibir y mantener el casete 10 en un estado operativo cuando un líquido de muestra se ha añadido al casete 10. En particular, el cajón 50 está al bias para encajar con muescas guía, como las muescas 52, en el cuerpo de casete 12 para sujetar el casete 10 con la carcasa 50 en una posición deseada.

El instrumento incluye además un actuador 53 que tiene pistones o empujadores activados por solenoide indicados con 54, manejables para engancharse con el soporte del casete 14 y mover el soporte 14 de su estado de reposo a su posición de transferencia de muestra cuando una unidad de control 55 actúa en el instrumento 48. En particular, la unidad de control 55 se puede programar o ajustar por el usuario para controlar uno o más de los siguientes actuadores variables:

- (i) el periodo entre la adición de muestra en la transferencia de muestra del casete a la tira 30. Este tiempo corresponde aproximadamente al periodo de incubación de la exposición del líquido de muestra a, y reacción con, la primera composición de reactivo, y puede variar desde un óptimo de unos segundos hasta 10 minutos o más, dependiendo de la naturaleza de la primera reacción de muestra.
- (ii) la frecuencia de ciclo con la que el actuador 53 mueve el soporte 14 hacia delante y atrás de su posición de transferencia. La frecuencia se puede variar entre uno por ensayo a unos pocos por minuto a uno por segundo.
- (iii) el tiempo de contacto que se mantiene el soporte 14 en su posición de transferencia durante cada ciclo. Junto con la frecuencia, esta variable define la velocidad total a la que el líquido de muestra se transfiere a la tira de reactivo 30. Esta velocidad se puede optimizar para tipos diferentes de químicas de ensayo. Por ejemplo, puede ser deseable regular el flujo de material del pocillo de muestra 18 a través del depósito de reactivo 24 para asegurar un tiempo de reacción suficiente en el depósito de reactivo 24, o medir la velocidad de flujo por la tira de reactivo 30 para asegurar un tiempo de reacción adecuado en la tira 30.
- (iv) el número total de ciclos de transferencia que, junto con el tiempo de contacto en cada ciclo, determinará el volumen total transferido del cuerpo de casete 12 a la tira 30. Controlando el volumen total transferido, se puede determinar una medida más cuantitativa de la concentración de analito expresado en cantidad de analito/volumen de muestra. En particular, el volumen que pasa por la zona de detección 34 será la cantidad total transferida menos una cantidad predeterminada que queda en la parte de la tira 30 hacia arriba de la zona de detección 34.

Hay que notar que la unidad de control 55 se puede preprogramar para controlar la transferencia de líquido en el ensayo de una manera optimizada para cualquier tipo elegido de química de ensayo. Varios perfiles de transferencia de líquido que se pueden obtener con la invención se considerarán más adelante.

También como se muestra en la Fig. 5, el instrumento para manejar el casete 48 incluye un fotodetector 56 manejable para detectar cambios en la reflectancia de la zona de detección, como se observa por la ventana 36. En este caso, el fotodetector 56 puede ser un sencillo dispositivo para medir la intensidad de luz de reflectancia en la ventana 36 cuando la ventana de detección 36 está iluminada por una fuente de luz, por ejemplo, un LED que también forma parte del detector 56. En otros modos de realización, el detector 56 puede incluir un detector de luz emitida y rayo de excitación fluorescente de longitud de onda seleccionada, o una fuente de luz visible de longitud de onda seleccionada y fotodetector para medir la absorción de luz en la superficie de detección.

Particularmente donde el detector de luz 56 está diseñado para medir la reflectancia desde la superficie de la tira de reactivo en la zona de detección, la película reflectora es eficaz para aumentar, es decir, amplificar la intensidad de reflectancia y mejorar así la resolución y la exactitud. Como se verá en la siguiente sección, la reflectancia aumentada también permite que la zona de detección sirva como un “control” para monitorizar el flujo de fluido por la tira de reactivo 30.

II. Características de rendimiento

Como se ha mencionado anteriormente, una característica de la invención es la capacidad de controlar la velocidad y el volumen del flujo de fluido de un área de reacción a otra, y así las cinéticas de las reacciones y el volumen total del ensayo. Esta característica es importante cuando una o más reacciones de ensayo son de paso limitante o cuando se quiere ensayar un punto final cinético. La característica también es importante para controlar la cantidad total de líquido de muestra que fluye hasta el interior y a través de la zona de detección 34, para cuantificar la concentración de analito en la zona 34.

Las Figs. 6A y 6B ilustran dos curvas de transferencia de muestra que ilustran las diferentes características de transferencia de muestra que se pueden obtener en la invención. En el primer caso, ilustrado en la Fig. 6A, la muestra se añade al casete 10 en tiempo t_0 , y se la permite incubarse en el depósito de reactivo 24 hasta un tiempo t_1 , cuando la barra de soporte en el casete se pone en contacto con el depósito 24. Si la barra de soporte 28 se mantiene en contacto con el depósito 24 por un periodo de tiempo prolongado, la transferencia de muestra a la tira 30, expresada como volumen de muestra en función del tiempo, aumenta de forma lineal hasta un tiempo t_r cuando tanto la tira 30 como la almohadilla 38 se encuentran completamente saturadas (ignorando los efectos de evaporación de muestra).

En la Fig. 6B, el tiempo de incubación de muestra, de t_0 a t_1 , es el mismo que en la Fig. 6A pero la transferencia de muestra está afectada por tres eventos de transferencia diferenciados, intercalados por intervalos en los que el soporte deja el contacto con el depósito 24 y la acumulación de volumen durante todo el tiempo es plana. Como se puede ver, el último enfoque permite una velocidad de transferencia de volumen más controlada y típicamente más lenta que cuando la transferencia de muestra se realiza como un evento ininterrumpido.

La Fig. 7 muestra una curva de reflectancia a título de ejemplo de un ensayo en el que un analito de proteína C-reactiva reacciona primero con un anticuerpo antianalito marcado en el depósito de casete 24 para formar un complejo de anticuerpo y analito detectable, y luego se transfiere el complejo a la tira de reactivo 30 donde es atrapado por un anticuerpo antianalito soportado en la zona de detección 30. La reflectancia inicial durante los primeros pocos segundos después de la transferencia de muestra al soporte 14, corresponde a una reflectancia de tira seca. El descenso abrupto de reflectancia tiene lugar cuando el borde frontal de la muestra transferida pasa a través de la zona de detección 34. El descenso de reflectancia se debe tanto al humedecimiento de la tira 30 en la zona de detección 34 como a la presencia de anticuerpos marcados con oro coloidal, tanto en complejos como en forma no complejada.

Con un flujo continuo de material de muestra por la zona de detección 34, el nivel de reflectancia empieza de cambiar con el tiempo, dependiendo de la concentración relativa de conjugado de anticuerpo complejo y no complejo, es decir, dependiendo de la concentración de analito de muestra. A una concentración de analito más baja, donde hay relativamente más conjugado en forma no complejada y se atrapa relativamente menos conjugado en la zona de detección 34, la reflectancia empieza a aumentar con el tiempo a medida que más y más conjugado se lleva fuera de la zona de detección 34 por la transferencia de muestra a través de la zona 34. Esto se ve en la gráfica de “diamante” de la Fig. 7. En cambio, a concentraciones de analito más altas, se atrapa progresivamente más conjugado en la zona de detección 34, con flujo de muestra a través de la zona 34, actuando para bajar la reflectancia con el tiempo como se indica en la gráfica de “triángulo” de la misma figura.

La concentración de analito se mide comparando la reflectancia medida en un punto final elegido, por ejemplo 4 minutos, con mediciones de reflectancia estándares de concentraciones de analito conocidas. La reflectancia medida se puede expresar, por ejemplo, como una proporción entre el porcentaje de reflectancia final y el porcentaje de reflectancia inicial. Como se ve en la gráfica mostrada en la Fig. 8, una gráfica de esta relación muestra una curva dependiente del analito por una concentración de proteína C-reactiva de 0 a 8 $\mu\text{g/ml}$.

De lo precedente se puede notar cómo se obtienen varios objetos y características de la invención. El casete 10 proporciona un formato de ensayo de tira seca en el cual se pueden llevar a cabo de manera controlada reacciones

consecutivas dependientes del analito controlando la transferencia de velocidad y volumen de una región de reacción a otra. Además, el casete 10 está diseñado para permitir volúmenes de muestra controlados y medidos a través de la zona de detección 34, para una determinación más cuantitativa de la concentración de analito. El formato de casete sirve para ensayos múltiples en el mismo casete y alimentados de la misma muestra. Finalmente, la tira reflectora en la barra de soporte 28 actúa para aumentar los cambios de reflectancia, aumentando la fiabilidad y la resolución de un ensayo.

Preferiblemente, el casete 10 de la invención se suministra de soluciones y reactivos precargados y por lo tanto es completamente independiente, no necesitando la carga de soluciones por un operador. El lector 48 que contiene el casete 10 se puede programar para ajustar el casete a sus diferentes posiciones de funcionamiento en tiempos designados. Un ensayo de etapas múltiples se puede por tanto llevar a cabo con el casete 10 contenido dentro de un lector de casete 48, no necesitando aportación de un operador exterior.

Ejemplo 1

Ensayo para Proteína C-Reactiva

En una aplicación específica del presente dispositivo, se analiza una muestra sanguínea por niveles de proteína C-reactiva. Se ha demostrado que niveles alterados de este compuesto son diagnóstico de trastornos caracterizados por factores de riesgo para el derrame cerebral y la isquemia vascular cerebral, y el derrame y la cardiopatía isquémicos (véase, por ejemplo, De Maat, Grau, Kuller, Liuzzo, Mendall, Thompson y Tracy).

El casete 10 para el ensayo se preparó como sigue: La almohadilla central 20 es una almohadilla de fibra de vidrio capaz de absorber aproximadamente 20 μ l de líquido. La capa de extensión 22 también es de fibra de vidrio. El depósito 24 es de un material de plástico poroso con un volumen de absorción total de aproximadamente 6 μ l. El depósito 24 se empapó inicialmente con 6 μ l de una solución de 20 D.O. de conjugado de anticuerpo formado por oro coloidal conjugado con anticuerpo específico contra proteína C-reactiva obtenido de BBInternational (Cardiff, UK). Luego, se secó el depósito 24.

La tira de reactivo 30 en el casete 10 es una tira de nitrocelulosa de 11 mm por 3 mm, obtenida de Sartorius (Goettingen, GmbH), con un espesor de menos de 10 mils (0,25 mm). El anticuerpo contra la proteína C-reactiva se acopló a la región de detección 34 mediante interacción hidrofóbica con la nitrocelulosa. La región de detección 34 se ubicó aproximadamente a 6 mm de la región de transferencia de muestra 32. La almohadilla de absorción 38 del extremo hacia abajo de la tira 30 es de un material de fibra de celulosa con un volumen de absorción total de aproximadamente 25 μ l.

En el método de ensayo, se aplicó una muestra sanguínea humana de 50 μ l al pocillo de muestra 18 en el casete 10. Después de un periodo de incubación de 3 minutos, se movió el soporte 14 a su posición de transferencia de muestra durante 4 minutos. Durante el flujo de líquido de muestra a la tira 30, se monitorizó la reflectancia en la ventana 36 de la barra de soporte. A los 4 minutos aproximadamente, se alcanzó un punto final estable (Fig. 7). Se determinó la proporción de señal entre reflectancia de punto final y reflectancia inicial y se la usó para calcular la concentración de analito de una curva estándar generada por muestras con cantidades conocidas de proteína C-reactiva.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a procedimientos y modos de realización específicos, se notará que se pueden hacer varias modificaciones sin alejarse de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para llevar a cabo un ensayo para un analito de fluido corporal comprendiendo

- a) introducir un fluido corporal conteniendo el analito en un depósito de absorción (24) conteniendo una primera composición de reactivo eficaz para reaccionar con uno o más componentes de muestra para formar una muestra modificada,
- b) poner en contacto repetidamente el depósito (24), con tal depósito conteniendo una muestra de fluido corporal absorbida, con una tira de reactivo (30) que contiene una segunda composición de reactivo eficaz para reaccionar con la muestra modificada formada en dicho depósito (24) para producir un producto detectable dependiente del analito, y
- c) controlar la frecuencia y la duración de dicho contacto repetido, para controlar así el volumen y la velocidad de la transferencia del fluido de muestra desde el depósito (24) a la tira de reactivo (30).

2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha tira de reactivo (30) es una tira de reactivo alargada (30) que tiene una zona de transferencia de muestra (32) en la que el depósito (24) hace contacto con la tira (30), y una zona de detección (34) ubicada hacia abajo de la zona de transferencia (32).

3. El procedimiento de la reivindicación 2 para detectar un analito plurivalente en una muestra de fluido corporal líquida, en el que la primera composición de reactivo en el depósito de reactivo (24) incluye un conjugado no soportado de un anticuerpo antianalito y un grupo indicador detectable, la reacción para formar una muestra modificada incluye la unión del conjugado con el analito de muestra con el fin de formar un complejo de conjugado y analito, la composición de reactivo en la tira de reactivo (30) incluye un anticuerpo antianalito soportado en una región de detección en la tira de reactivo (30), y la reacción para formar un producto detectable dependiente del analito incluye la unión del complejo con el anticuerpo soportado para localizar el indicador detectable en el complejo en la zona de detección (34).

4. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que dicho conjugado no soportado es un conjugado de un anticuerpo antianalito y un indicador detectable seleccionado del grupo consistente en partículas metálicas, partículas marcadas con restos de color o fluorescentes, polímeros marcados con restos de color o fluorescentes, partículas y moléculas de color o fluorescentes.

5. El procedimiento de la reivindicación 4 para ser usado en la detección de analito de proteína C-reactiva en una muestra sanguínea, en el que el anticuerpo antianalito del conjugado no soportado en el depósito de reactivo (24) y el anticuerpo antianalito soportado en la tira de reactivo (30) son anticuerpos específicos contra un epítipo común en la proteína C-reactiva.

6. Aparato para ser usado en la detección de un analito en una muestra de fluido corporal líquida, comprendiendo

- i) un casete (10) teniendo
 - a) un cuerpo de casete (12) comprendiendo un depósito de reactivo que contiene una primera composición de reactivo eficaz para reaccionar con uno o más componentes de muestra para formar una muestra modificada;
 - b) un soporte (14) montado sobre dicho cuerpo (12) manejable para moverse hacia delante y atrás de una posición de transferencia para realizar una comunicación de fluido entre dicho depósito (24) y una tira de reactivo (30) llevada sobre dicho soporte (14); y
 - c) dicha tira de reactivo (30) conteniendo una segunda composición de reactivo eficaz para reaccionar con la muestra modificada formada en dicho depósito (24) para formar un producto detectable dependiente del analito;
- ii) un instrumento para manejar el casete (48) teniendo
 - a) una carcasa de casete (50) en el que se puede colocar el casete (10) de manera desmontable durante un ensayo de muestra;
 - b) un actuador (53) manejable para mover el soporte (14) en el casete (10) hacia delante y atrás de la posición de transferencia;
 - c) un detector (56) manejable para detectar una reacción específica de analito en la tira de reactivo; y
 - d) una unidad de control (55) manejablemente conectada con el actuador (53) para controlar el volumen y la velocidad de transferencia de muestra desde dicho depósito de reactivo (24) hasta

la tira de reactivo (30) durante un procedimiento de ensayo, donde la unidad de control (55) es manejable para controlar la velocidad de transferencia de muestra desde dicho depósito (24) hasta la tira de reactivo (30) moviendo repetidamente el soporte (14) en el casete (10) hacia delante y atrás de la posición de transferencia y controlando (i) la frecuencia de ciclo con la que el actuador (53) mueve el soporte (14) hacia delante y atrás desde su posición de transferencia y (ii) el tiempo de contacto que se mantiene el soporte (14) en su posición de transferencia durante cada ciclo.

7. El aparato de la reivindicación 6 en el que dicho cuerpo de casete (12) tiene un pocillo de muestra (18) para recibir dicha muestra con el fin de que ésta pueda migrar desde dicho pocillo de muestra (18) hasta el interior de dicho depósito (24).

8. El aparato de la reivindicación 7 en el que la primera composición de reactivo en el depósito de reactivo (24) incluye un conjugado no soportado de un anticuerpo antianalito y un grupo indicador detectable, la reacción para formar una muestra modificada incluye la unión del conjugado con el analito de muestra para formar un complejo de conjugado y analito, la composición de reactivo en la tira de reactivo (30) incluye un anticuerpo antianalito soportado en una región de detección (34) en la tira de reactivo (30), y la reacción para formar un producto detectable dependiente del analito incluye la unión del complejo con el anticuerpo soportado con el fin de localizar el indicador detectable en el complejo en la zona de detección (34).

9. El aparato de la reivindicación 8 en el que dicho conjugado no soportado es un conjugado de un anticuerpo antianalito y un indicador detectable seleccionado del grupo consistente en partículas metálicas, partículas marcadas con restos de color o fluorescentes, polímeros marcados con restos de color o fluorescentes, partículas y moléculas de color o fluorescentes.

10. El aparato de la reivindicación 9 para ser usado en la detección de analito de proteína C-reactiva en una muestra sanguínea, en el que el anticuerpo antianalito en el conjugado no soportado en el depósito de reactivo (24) y el anticuerpo antianalito soportado en la tira de reactivo (30) son anticuerpos específicos contra un epítipo común en la proteína C-reactiva.

11. El aparato de la reivindicación 8 en el que dicho soporte (14) incluye una ventana (36) por la cual dicho detector (56) puede detectar una reacción detectable en la zona de detección (34) en la tira de reactivo (30).

12. El aparato de la reivindicación 6 en el que dicha unidad de control (55) es manejable para controlar el volumen y la velocidad de transferencia de muestra desde el depósito de reactivo (24) hasta la tira de reactivo (30) controlando además el período de incubación de muestra antes de transferir primero la muestra desde el depósito (24) hasta la tira de reactivo (30).

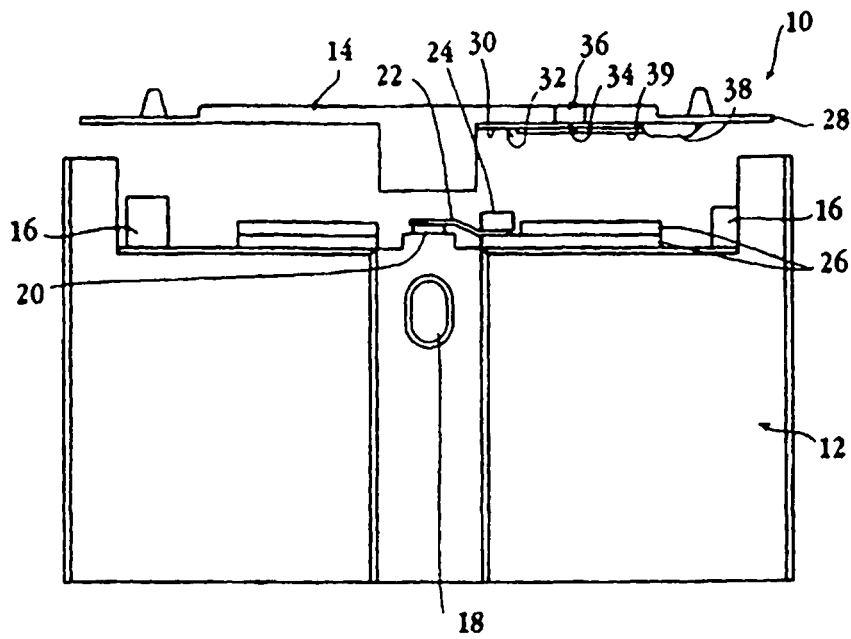


Fig. 1A

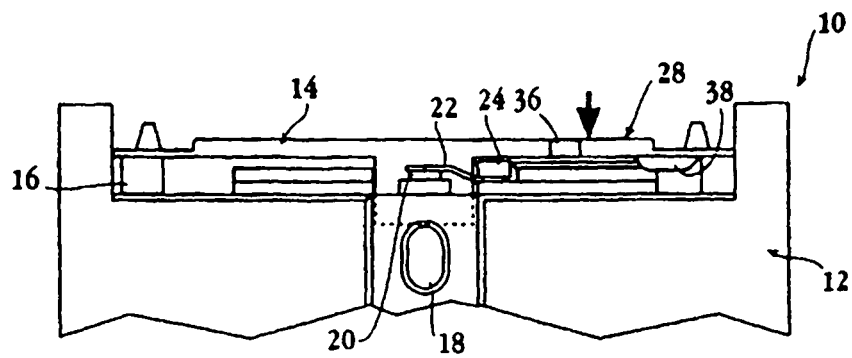


Fig. 1B

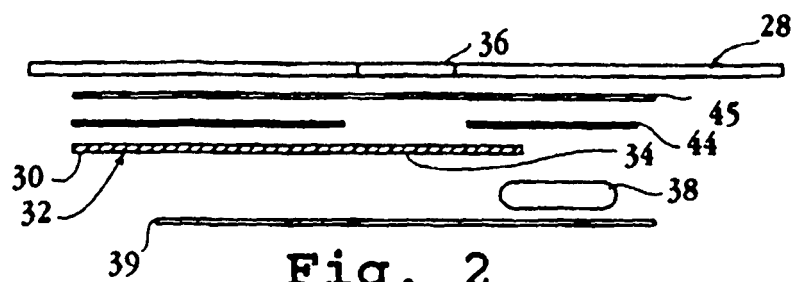


Fig. 2

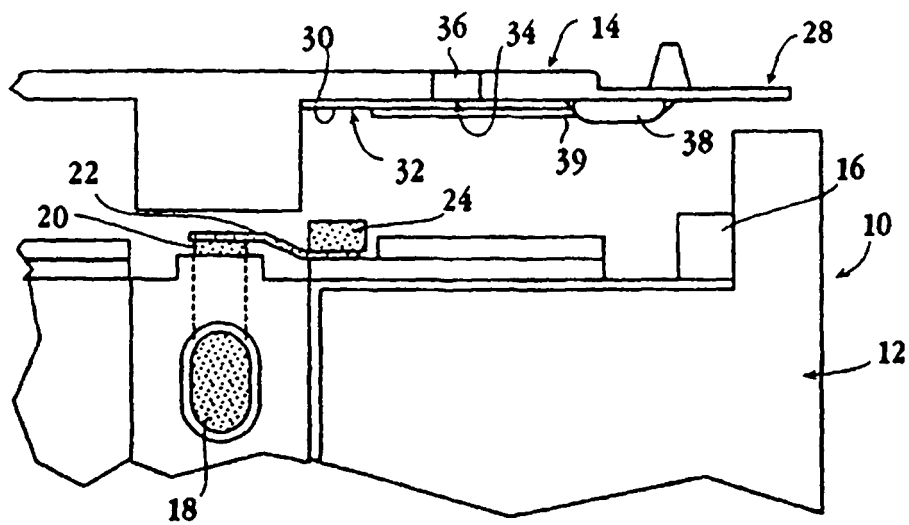


Fig. 3A

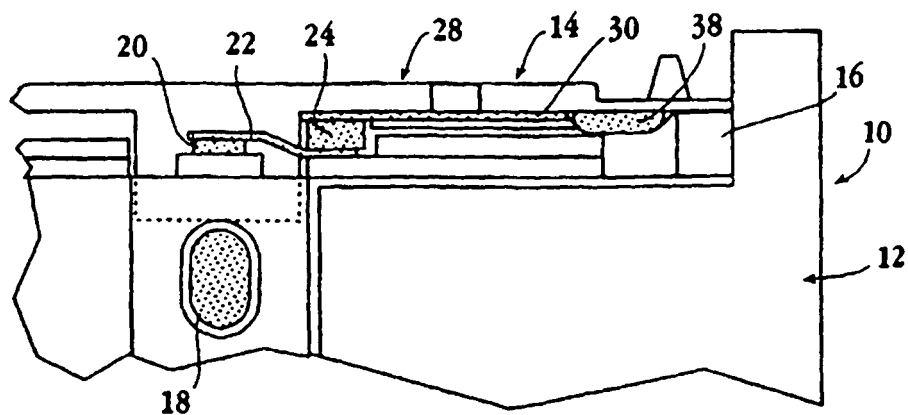


Fig. 3B

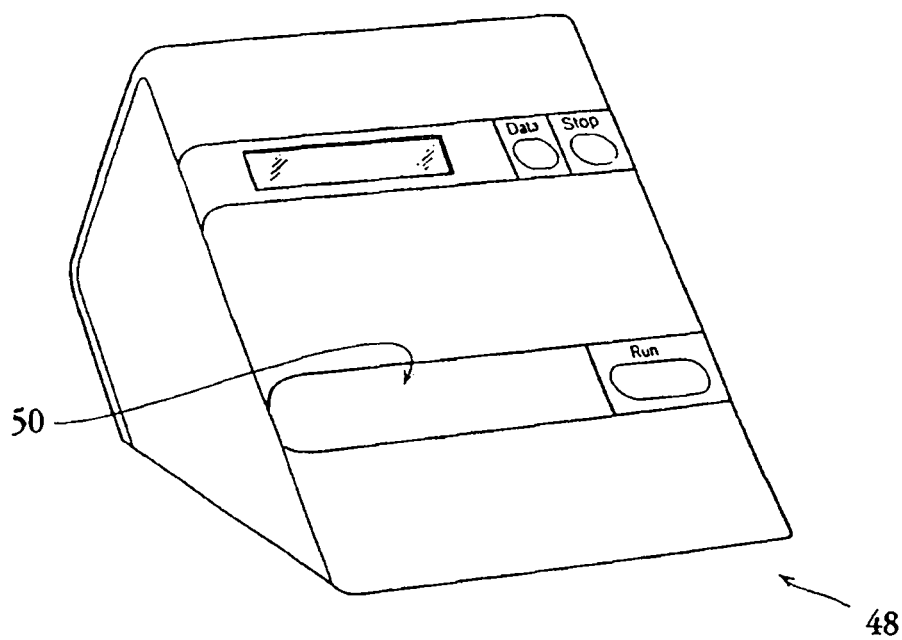


Fig. 4

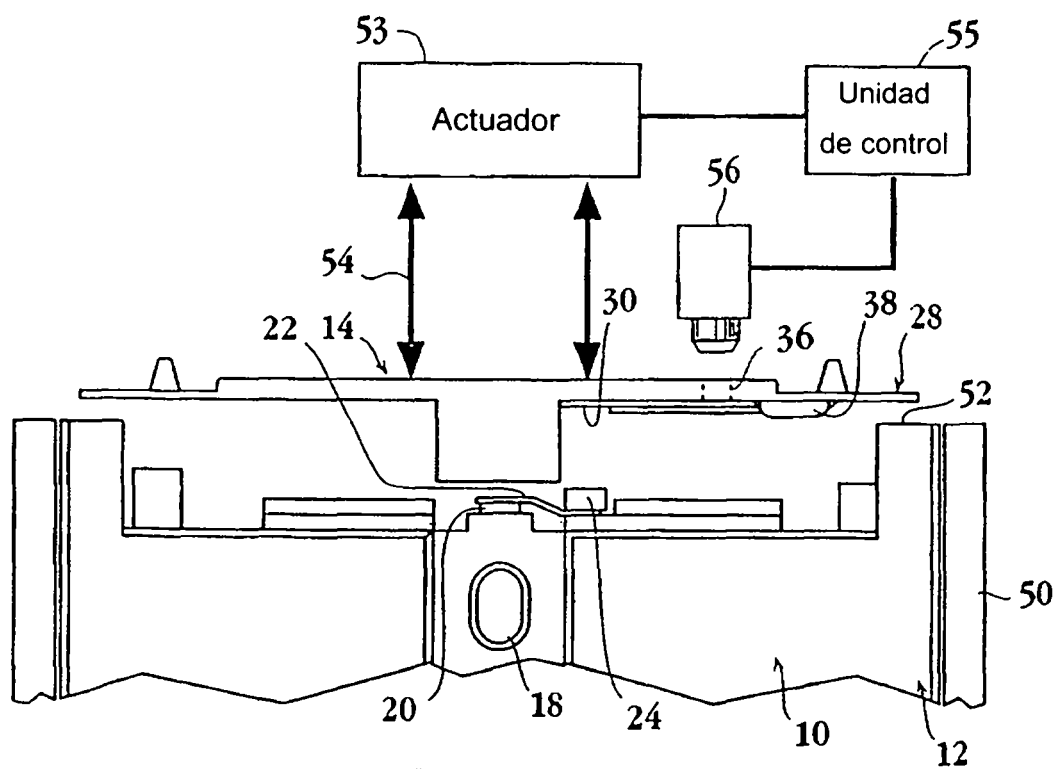


Fig. 5

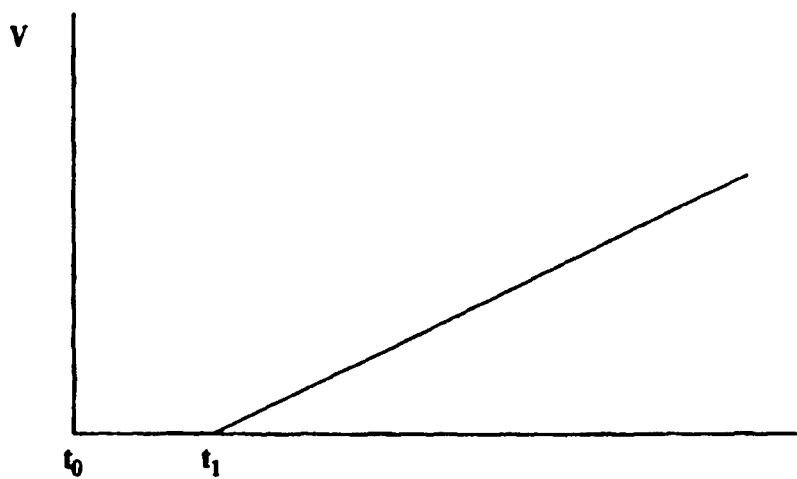


Fig. 6A

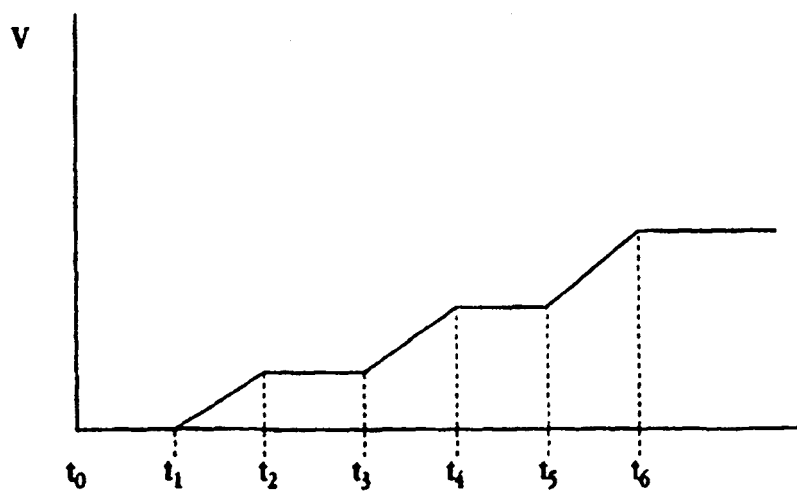


Fig. 6B

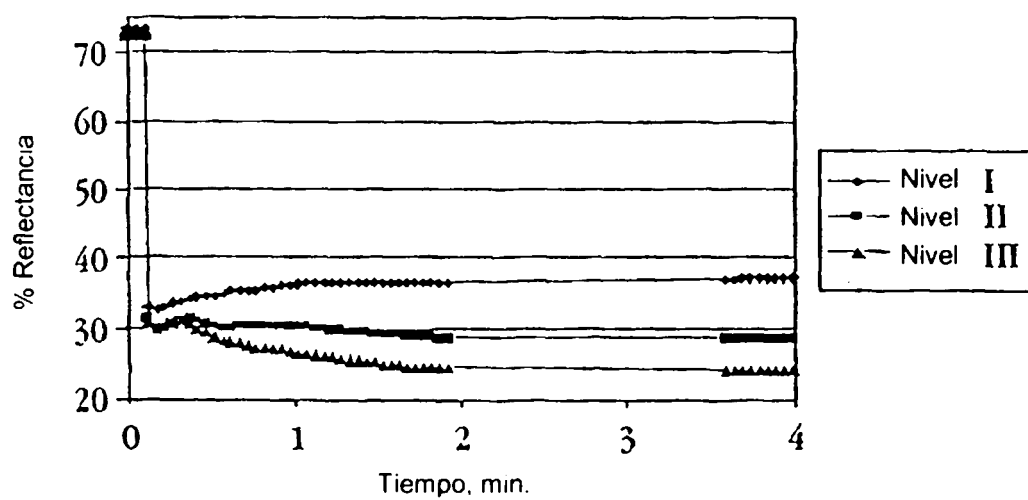


Fig. 7

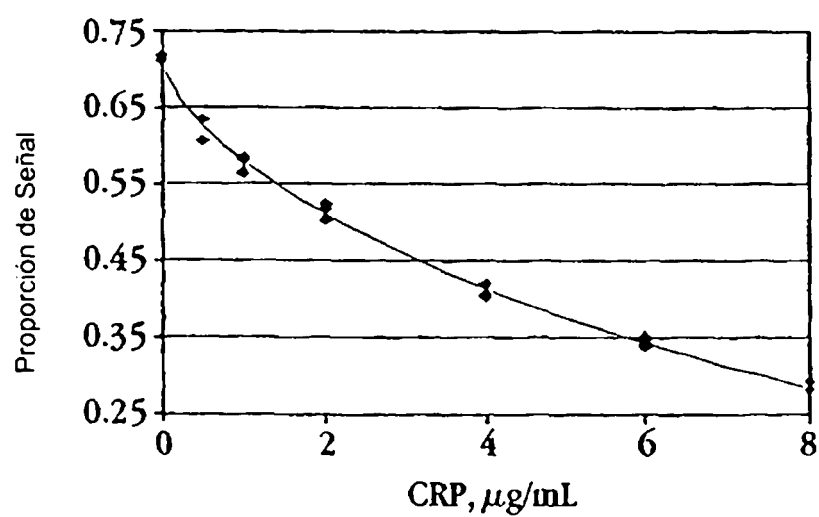


Fig. 8