

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 377**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007 E 07751240 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2215450**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la detección de analitos**

30 Prioridad:

21.02.2006 US 775649 P

05.04.2006 US 789345 P

22.11.2006 US 866932 P

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

10.12.2013

73 Titular/es:

NEXUS DX, INC. (100.0%)
6759 Mesa Ridge Road Suite 100
San Diego, California 92121 , US

72 Inventor/es:

BOOKER, DAVID, DICKSON;
LIDGARD, GRAHAM, PETER;
EGAN, RICHARD, LASWELL y
JOHNSON, CHRISTOPHER, JOHANN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 433 377 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

Procedimientos y composiciones para la detección de analitos.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere ensayos para analitos(s), por ejemplo, antígenos, en una muestra tal como una muestra biológica obtenida de un animal. En particular, la invención se refiere a unos procedimiento y dispositivo(s) para la detección de un/unos analito(s) utilizando restos de unión que seleccionan como diana específicamente un analito seleccionado. Más particularmente, los analitos que van a detectarse incluyen agentes infecciosos y/o componentes de los mismos.

Se han utilizado muchos tipos de ensayos para detectar la presencia de diversas sustancias, a menudo denominadas generalmente analitos o ligandos, en muestras corporales. Estos ensayos implican normalmente reacciones de antígeno-anticuerpo, ligando, antiligando, ligando-receptor y utilizan conjugados sintéticos que comprenden etiquetas solubles radiactivas, enzimáticas fluorescentes o metálicas observables visualmente, y especialmente cámaras de reactor diseñadas. Las pruebas más actuales están diseñadas para realizar una determinación cuantitativa, pero en muchas circunstancias todo lo que se requiere es una indicación cualitativa o positiva/negativa. Se han utilizado ensayos para detectar agentes infecciosos, tales como virus de la gripe.

Incluso los ensayos de positivo/negativo deben ser muy sensibles debido a la a menudo pequeña concentración del analito de interés en el fluido de prueba. Los falsos positivos también pueden ser problemáticos, particularmente con la aglutinación y otros procedimientos de detección rápida tales como una tira reactiva y pruebas de cambio de color. Debido a estos problemas, se han desarrollado ensayos de tipo sándwich y otros procedimientos de detección sensibles que utilizan dispersiones coloidales de metales u otros tipos de partículas coloreadas. Estas técnicas no han solucionado todos los problemas encontrados en estos procedimientos de detección rápida. Además, con el surgimiento de agentes altamente patógenos tales como virus de la gripe, resulta necesario desarrollar sistemas y procedimientos de laboratorio o punto de atención eficaces que puedan detectar de manera eficaz y precisa uno o más agentes infecciosos, tales como tipos de influenza o cepas dentro de los subtipos.

Se observa comúnmente la gripe en brotes locales o epidemias por todo el mundo. Pueden aparecer epidemias en cualquier momento y pueden producirse de manera fulminante con poco o ningún aviso. El número de personas afectadas puede variar desde unos cuantos cientos a cientos de miles. Las epidemias pueden ser de corta duración, durando días o semanas pero las epidemias más largas pueden persistir meses. Aunque la gripe es una enfermedad leve en la mayoría de los individuos, es potencialmente mortal para los individuos ancianos, los muy jóvenes o debilitados. Las epidemias son responsables de grandes pérdidas de productividad. Por tanto, resulta necesario desarrollar dispositivos y procedimientos para detectar eficazmente qué tipos y subtipos de un patógeno, tal como virus de la gripe, están presentes en muestras obtenidas de sujetos con el fin de determinar si la infección está provocada por un subtipo típico o esperado de virus de la gripe (gripe estacional) o un subtipo que es el agente causante de una epidemia o pandemia.

Es un objetivo de esta invención proporcionar un procedimiento rápido, sensible para detectar analitos en una muestra biológica. Otro objetivo es proporcionar un ensayo que presenta alta sensibilidad y menos falsos positivos que los ensayos convencionales. Un objetivo adicional es proporcionar un aparato o sistema para la detección de bajos niveles de analitos presentes en muestras biológicas. Otro objetivo es proporcionar un sistema de ensayo que implica un número mínimo de etapas de procedimiento, y produce resultados fiables incluso cuando se utiliza por personas no adiestradas. Un objetivo adicional es proporcionar un sistema para someter a prueba agentes infecciosos, que proporciona resultados que identifican uno o más agentes infecciosos en cuestión de minutos. Un objetivo adicional proporciona un sistema en el que los resultados en un instrumento de prueba son igualmente específicos y sensibles para los analitos diana, a pesar de que los resultados puedan leerse de una a varias horas tras la finalización de una reacción necesaria para obtener un resultado. Estos y otros objetivos y características de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones siguientes.

El documento EP0299428 da a conocer varias de las características del sistema de la presente solicitud. Sin embargo, el documento EP0299428 no da a conocer la utilización de restos de captura de polinucleótido para "clasificar" diversos inmunocomplejos en sus posiciones respectivas en las zonas de captura (tal como se reivindica en la presente memoria). Además, el documento EP0299428 también enseña claramente que se proporcionan reactivos para el flujo lateral tal como se describe en las reivindicaciones del documento EP0299428. La técnica anterior enseña claramente la disposición de los reactivos de unión en la tira de prueba. Por ejemplo, el documento US5602040 requiere claramente un ensayo de flujo lateral de "todo en uno" en el que los inmunorreactivos se disponen sobre la tira. Tales pruebas son adecuadas particularmente cuando la muestra es líquida (por ejemplo, orina, suero) o el analito está presente en cantidades relativamente grandes.

Sumario de la invención

Formas de realización:

- 5 1. Un sistema para detectar una pluralidad de analitos que comprende:
 - (a) un dispositivo de prueba de flujo lateral que comprende una tira absorbente y una cámara aguas arriba que contiene un tampón de lavado liberable, comprendiendo tira absorbente:
 - 10 (i) una zona de aplicación de muestra,
 - (ii) una zona de detección que comprende una o más bandas oligonucleotídicas diferenciadas unidas de manera no difusiva a dicha tira, y
 - 15 (iii) una zona de control; y
 - (b) un dispositivo de recogida de muestras independiente de dicho dispositivo de prueba adecuado para la extracción de analito de una muestra, y configurado para interconectarse con una abertura del dispositivo de prueba de flujo lateral para el suministro de muestra líquida a la zona de aplicación de muestra, comprendiendo el dispositivo de recogida de muestras: reactivo de extracción en un volumen de desde 50 hasta 100 µl, reactivos para un inmunoensayo en forma secada sólida para la extracción con la muestra, comprendiendo los reactivos un primer conjugado y un segundo conjugado para cada uno de dichos analitos:
 - 20 (i) comprendiendo cada dicho primer conjugado una pareja de unión específica para su analito, y un oligonucleótido que presenta una secuencia complementaria a un oligonucleótido de una de dichas bandas diferenciadas; y
 - 25 (ii) comprendiendo cada dicho segundo conjugado una pareja de unión específica para su analito, y un marcador.
- 30 2. El sistema de la forma de realización 1, en el que los oligonucleótidos son pARN, presentando el pARN de cada banda diferenciada una secuencia diferente.
- 35 3. El sistema de la forma de realización 1, en el que el dispositivo de prueba comprende además un mecanismo para liberar el tampón de lavado puncionando, presionando o rompiendo un compartimento para el tampón de lavado.
- 40 4. El sistema de la forma de realización 3, en el que el compartimento comprende una ampolla o membrana blanda.
- 45 5. El sistema de la forma de realización 1, en el que el dispositivo de recogida de muestras comprende los primer y segundo conjugados en una primera cámara sellada, y comprende además un tampón de extracción de muestra en una segunda cámara, en el que el tampón de extracción puede liberarse de modo que se permite la comunicación fluídica entre la primera cámara y la segunda cámara.
- 50 6. El sistema de la forma de realización 1, en el que los primer y segundo conjugados están en forma de un gránulo.
- 55 7. El sistema de la forma de realización 1, en el que las parejas de unión específica se seleccionan independientemente de anticuerpos monoclonales y policlonales.
8. El sistema de la forma de realización 1, en el que la zona de control comprende un elemento de unión específica inmovilizado para un reactivo de control marcado, estando alojado el reactivo de control marcado en dicho dispositivo de recogida de muestras.
9. El sistema de la forma de realización 1, en el que el dispositivo de prueba comprende una abertura u orificio para recibir el dispositivo de recogida de muestras para la aplicación de la muestra.
- 60 10. El sistema de la forma de realización 1, en el que el marcador es un marcador particulado seleccionado de oro coloidal, una partícula teñida o coloreada o un marcador particulado que comprende un metal lantánido.
- 65 11. El sistema de la forma de realización 10, en el que el marcador es una partícula de quelato de europio (III) fluorescente.
12. El sistema de la forma de realización 1, en el que el sistema comprende además un lector de fluorescencia.

13. El sistema de la forma de realización 12, en el que lector de fluorescencia comprende una lámpara que emite UV A y/o un patrón duro.

5 14. El sistema de la forma de realización 1, en el que los analitos son de uno o más agentes infecciosos.

15. El sistema de la forma de realización 14, en el que se selecciona al menos un agente infeccioso de virus de la gripe, VIH, virus de la hepatitis, adenovirus, enterovirus y virus parainfluenza.

10 16. El sistema de la forma de realización 15, en el que dicho(s) agente(s) infeccioso(s) son virus de la gripe seleccionados independientemente de virus de la gripe A, B, C.

17. El sistema de la forma de realización 16, detectando el sistema antígenos H1 y H3 de virus de la gripe tipo A.

15 18. El sistema de la forma de realización 16, detectando el sistema virus de la gripe H1N1 o H5.

Breve descripción de los dibujos

20 Las características nuevas de la invención se exponen con mayor detalle en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone unas formas de realización ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

25 La figura 1 ilustra un dispositivo de recogida de muestras.

La figura 2A ilustra un dispositivo de recogida de muestras con una vista en ampliación de un compartimento de mezclado.

30 La figura 2B ilustra un conjunto de toma de muestras.

La figura 3 ilustra un dispositivo de prueba.

La figura 4 ilustra un lector.

35 La figura 5 ilustra un dispositivo de recogida de muestras.

La figura 6 ilustra un dispositivo de recogida de muestras.

40 La figura 7 ilustra un dispositivo de prueba que comprende un medio de huecos.

La figura 8 ilustra un dispositivo de recogida de muestras y un dispositivo de prueba.

La figura 9A y 9B ilustra tiras de prueba sometidas a prueba con un volumen diferente de tampón de extracción.

45 Las figuras 10A y 10B ilustran los efectos de la limpieza del fondo y diversas cantidades de tampón de extracción.

La figura 11 ilustra dos pruebas diferentes para la detección de virus de la gripe A.

50 La figura 12 ilustra dos pruebas diferentes para la detección de virus de la gripe A y virus de la gripe B.

La figura 13 ilustra la detección de virus de la gripe A utilizando oro como marcador.

La figura 14 ilustra la detección de virus de la gripe B utilizando oro como marcador.

55 La figura 15 ilustra la detección de virus de la gripe A utilizando conjugado de europio.

La figura 16 ilustra la detección de virus de la gripe B utilizando conjugado de europio.

60 La figura 17 ilustra la sensibilidad del conjugado de europio en la detección de virus de la gripe B.

La figura 18 ilustra tiras sometidas a prueba con subtipos de virus de la gripe A.

La figura 19 ilustra el control de sólo tampón.

65 La figura 20 ilustra la prueba para virus de la gripe A y el subtipo H3N2.

La figura 21 ilustra la prueba para virus de la gripe B.

La figura 22 ilustra la prueba para virus de la gripe A y el subtipo H5N1.

La figura 23 ilustra la prueba para virus de la gripe A y el subtipo H1N1.

La figura 24 ilustra la prueba para virus de la gripe B y virus de la gripe A subtipo H5N1.

La figura 25 ilustra la prueba para el virus de Epstein-Barr

La figura 26 ilustra un dispositivo de prueba que comprende múltiples líneas de prueba para diferentes tipos y subtipos de un analito; 901 filtro o lecho de muestra sobre el que se aplica una muestra; 902 lecho de reactivo; 903 línea de prueba para el tipo 1 de un analito/agente infeccioso; 904 tipo 2 de un analito/agente infeccioso; 905 subtipo del tipo 1 o tipo 2; 906 subtipo del tipo 1 o tipo 2; 907 línea de control.

La figura 27 ilustra diversos aspectos de un dispositivo de prueba; (A) un dispositivo de prueba 1001 ensamblado; (B) un dispositivo de prueba no ensamblado con una tira superior 1002, inferior 1004 y de prueba 1003, así como la abertura/orificio para recibir una muestra 1005; (c) una vista más próxima al compartimento de resorte/botón que puede pulsarse para desgarrar, romper o puncionar un compartimento de tampón/líquido dispuesto por encima de la membrana/lecho 1006 que está en comunicación fluidica con la tira de prueba 1003.

La figura 28(A) ilustra una forma de realización en la que se proporciona un cierre de casquillo que conecta un componente de SCD 1101 y dispositivo de prueba 1105, en el que el bloqueo de casquillo 1104 proporciona canales/poros 1103 en una configuración geométrica que se abre a un compartimento aguas arriba 1102 sólo cuando se abre la posición de bloqueo (es decir, permitiendo el flujo de fluido desde el compartimento de tampón/líquido aguas arriba lateralmente a través del dispositivo de prueba. El compartimento aguas arriba 1102 puede ser una ampolla o una bolsa llena formada.

La figura 28(B) ilustra una forma de realización de un dispositivo de prueba por la cual el dispositivo comprende una cubierta 1107 de protección sobre el compartimento aguas arriba 1106 que contiene un líquido (por ejemplo, tampón de lavado/ejecución). Además, el dispositivo comprende un depósito 1109 en comunicación fluidica con la abertura/orificio 1108 de muestra, depósito que puede comprender una membrana o compartimento para retener una muestra de archivo.

La figura 28: (C) ilustra un compartimento (por ejemplo, ampolla) 1111 dispuesto en un dispositivo de prueba con un punto 1110 de rotura, en el que el dispositivo de prueba está configurado para proporcionar una depresión/canal 1112 y un sustrato de soporte 1113 que dirige el contenido líquido de la ampolla aguas abajo hasta la tira de prueba; (D) proporciona una vista superior del compartimento que comprende una bolsa/ampolla 1114 situada aguas arriba de donde se produce la introducción 1115 de la muestra, configurado para proporcionar una rampa 1119 de fluido y soportes 1118 a través de los cuales el contenido del compartimento alcanza un espacio 1117 que está en comunicación fluidica con un lecho de mecha 1116.

La figura 29 proporciona una ilustración de un dispositivo de toma de muestras con un componente de archivo; el hisopo de toma de muestras 1205 está fijado a un eje 1201 hueco y está flanqueado por manguitos 1202 aguas arriba de una frita 1206 y 1203 hidrófoba (10+u) seguida por (figura 29B) un papel de filtro que puede presentar diversas formas con zonas para retener una muestra de archivo 1209 y tres zonas 1210 dimensionales que pueden retener por ejemplo una píldora/perla de reactivo. Además, las píldoras/perlas de reactivo pueden estar dispuestas también en el compartimento aguas abajo del papel 1208 de filtro, lo que puede permitir el mezclado antes de expulsar la muestra a través de la punta 1204.

La figura 30 ilustra (A) los resultados de la tira de pruebas estriada utilizando pARN y (B) anticuerpos monoclonales.

La figura 31 ilustra una comparación de sensibilidad utilizando pARN y anticuerpo.

La figura 32 proporciona un esquema de la unión a pARN de múltiples analitos sobre una tira de prueba.

Figura 33. Patrones duros; (A) gráfico de seis concentraciones diferentes de europio tal como se lee en un lector UV LED; (B) fotografía de los seis patrones duros; (C) gráfico para la concentración n.º 1; (D) gráfico para la concentración de n.º 5; (E) gráfico para la concentración n.º 3; (F) gráfico para la concentración de n.º 6; (G) gráfico para la concentración de n.º 2; (H) gráfico para la concentración de n.º 4.

Figura 34. Patrones duros; (A) proporciona un gráfico para 7 patrones duros diferentes tal como se lee mediante un lector UV LED; (B) proporciona un dispositivo de prueba con múltiples ventanas a través de las cuales se detecta la señal cuando se coloca el dispositivo de prueba en un lector.

La figura 35 ilustra una forma de realización en la que un compartimento aguas arriba 1401 (por ejemplo, ampolla) que contiene un líquido está en comunicación fluidica con un lecho de mecha 1402 seco que se hincha cuando se manipula dicho compartimento para liberar su contenido líquido, en el que dicho hinchamiento aumenta el tamaño del lecho de mecha 1403 de modo que se pone en comunicación fluidica con una muestra 1405 dispuesta sobre una tira de prueba 1406. Por tanto, basándose en la densidad/tipo de material 1402 de mecha, puede introducirse un retraso temporal predeterminado en el sistema desde el punto de liberación hasta el punto de inicio del flujo de la muestra 1405 a través de la tira de prueba 1406.

La figura 36 ilustra la intensidad de fluorescencia de virus del subtipo H5N1.

La figura 37 representa un gráfico de la intensidad de fluorescencia de virus del subtipo H1N1.

La figura 38 representa un gráfico de la intensidad de fluorescencia de virus de la gripe B.

La figura 39 ilustra la sensibilidad utilizando un sistema de AcM.

La figura 40 ilustra la sensibilidad utilizando un sistema de pARN.

La figura 41 ilustra la sensibilidad utilizando un sistema de pARN y bloqueo de membrana.

La figura 42 proporciona una comparación de la sensibilidad para AcM, pARN y pARN con bloqueo.

Descripción detallada de la invención

Diversos aspectos de la presente invención se refieren a dispositivos y ensayos de parejas de unión que utilizan restos de captura y restos de unión específicos para el análisis cualitativo y/o cuantitativo de analitos seleccionados en muestras. La invención es útil en una variedad de ensayos que se utilizan para detectar uno o más agentes infecciosos presentes en una muestra. Los ensayos útiles en la invención comprenden de manera no limitativa inmunoensayos competitivos, inmunoensayos no competitivos, inmunoensayos de tipo sándwich y ensayos de bloqueo.

Sin embargo, la utilización de la invención no se limita a inmunoensayos, ya que otros ensayos incluyendo ligando-receptor, ligando-proteína de unión, aptámero-agente de unión, enzima-sustrato, reacciones químicas o bioquímicas se detectan utilizando un dispositivo o procedimiento de la invención. En un aspecto de la invención, los procedimientos y sistemas de la invención utilizan un dispositivo de recogida de muestras, un dispositivo de prueba y un lector. Se conocen diversos protocolos de ensayo, reactivos, dispositivos o analitos específicos útiles en la puesta en práctica de la invención, véanse, por ejemplo, las patentes US n.^{os}: 4.313.734; 4.366.241; 5.266.266; 6.235.539; 6.468.474; 6.565.808; 6.448.001; o 5.415.994, así como las publicaciones US n.^{os} 2006/0040405; 2004/0014094; 2004/0048395; o 2005/0130120.

En un aspecto de la invención, se utiliza un dispositivo de recogida de muestras para recoger una muestra y procesar una muestra con reactivos inmunorreactivos que proporcionan unos medios de detección y unos medios de captura, muestra procesada que se proporciona posteriormente a un dispositivo de prueba, que proporciona unos medios para leer/observar señales proporcionadas por dichos medios de detección. Las señales pueden leerse a simple vista o con un instrumento dependiendo de la combinación de medios de detección (por ejemplo, marcadores de conjugados) utilizados. Además, el dispositivo de prueba puede estar configurado para permitir la detección de múltiples analitos. Tales analitos pueden ser de uno o más agentes infecciosos, incluyendo diferentes cepas y/o subtipos. La detección puede incluir mediciones cualitativas y/o cuantitativas de uno o más analitos.

Dispositivo de recogida de muestras. Un aspecto de la invención se refiere a un dispositivo de recogida de muestras (SCD) que comprende los medios necesarios para recoger una muestra biológica, así como los reactivos y tampones necesarios para procesar la muestra y hacer reaccionar los reactivos de unión con uno o más analitos diana. Tal como se muestra en la figura 2B, un SCD ejemplificativo comprende una cámara superior 210 a la que está fijado un soporte de instrumento de toma de muestras 209, un vástago 208 y un instrumento de toma de muestras 207, formando conjuntamente un conjunto de toma de muestras.

El conjunto de toma de muestras de la figura 1 puede retirarse de una carcasa que comprende un tubo de recepción de muestras 103, un área 104 de reactivo o mezclado de la cámara inferior, que puede contener reactivos que se unen específicamente a uno o más antígenos diana. La cámara inferior 104 puede comprender uno o más compartimentos. Por ejemplo, pueden estar dispuestos dos compartimentos en serie en la cámara inferior. El conjunto de toma de muestras está colocado en la parte de tubo de recepción de muestras 103 de la carcasa para proporcionar una configuración integrada. En una configuración de este tipo, un instrumento de toma de muestras 107 está aguas arriba de y en comunicación fluidica con la cámara inferior. La longitud del conjunto de toma de muestras puede optimizarse para la recogida de muestras, por ejemplo, recogida de muestras nasales y de la garganta. Por ejemplo, la longitud del dispositivo (por ejemplo, configuración integrada) puede ser de

aproximadamente 1 a 9 pulgadas, o aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 pulgadas.

El vástago 102 puede ser hueco, sólido o semiporoso. Por tanto, en algunas formas de realización, el vástago proporciona realmente una trayectoria de comunicación fluidica desde la cámara superior 100 hasta el instrumento de toma de muestras 107 (por ejemplo, hisopo). El vástago se sujeta por el soporte de muestra 101 que se ajusta en un extremo de recepción de la cámara superior 100. Por ejemplo, el vástago puede ser hueco o semipermeable y una parte del vástago que puede extenderse en el interior de la cámara superior presenta un extremo terminal que está cerrado, de modo que si la parte del vástago en la cámara superior se encaja o se rompe, entonces se proporciona comunicación fluidica (es decir, flujo de fluido) entre la cámara superior a través del extremo distal del vástago hasta un instrumento de toma de muestras (por ejemplo, hisopo) que comprende una muestra (por ejemplo, muestra biológica).

Una cámara superior puede comprender uno o más compartimentos. La cámara superior puede estar realizada en un material semirrígido o depresible, y conformada como un bulbo 99. Un bulbo de este tipo puede comprender una disolución.

La cámara superior puede sellarse. Además, un sello de este tipo puede puncionarse, romperse o abrirse mediante una estructura de válvula, de modo que se proporciona comunicación fluidica entre la cámara superior y la cámara inferior. En algunas formas de realización, la disolución en la cámara sellada superior es una disolución tampón. En diversas formas de realización, el volumen de una disolución en la cámara superior es de desde aproximadamente 10-500 µl, o desde aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370; 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 o 500. En una forma de realización, el volumen de la disolución es de hasta 150 µl.

En algunas divulgaciones, puede disponerse una disolución líquida que comprende los reactivos necesarios (por ejemplo, agentes de unión específica de captura/detección, etc.) en la zona de reactivos de la cámara inferior en comunicación de líquido con la cámara superior. Tal como se muestra a título de ejemplo en la figura 2A, el fluido de la cámara superior fluye hasta el instrumento de toma de muestras para extraer la muestra y la muestra extraída pasa a través de una abertura que puede restringir/controlar el flujo de líquido desde la cámara superior hasta la cámara inferior que comprende, por ejemplo, una abertura para controlar el flujo mediante el tamaño, por ejemplo, el tamaño de las perforaciones o el tipo de sustrato o filtro que está dispuesto en el extremo proximal 201 de un compartimento en la cámara inferior. La cámara inferior puede contener un área de reactivos. En una forma de realización, el área de reactivos (por ejemplo, 203) contiene un sustrato sólido que incluye los reactivos 202 necesarios (por ejemplo, reactivos de inmunoensayo, tales como sondas de detección y captura, etc.), formados como un sólido secado, dispuestos por separado o en un sólido unificado.

Por tanto, cuando se lava hacia abajo una muestra mediante las disoluciones (por ejemplo, tampón) en la cámara superior, se produce una mezcla portadora de la muestra que se desplaza hasta la zona de reactivos de la cámara inferior, cámara que comprende el sustrato que contiene reactivo sólido 202. El reactivo sólido se disuelve rápidamente mediante el tampón y la disolución resultante es una mezcla de muestra que puede contener analito(s) de interés, y los reactivos de inmunoensayo (por ejemplo, agentes de unión específica, conjugado de marcador y sondas de captura, etc.). Por ejemplo, un reactivo sólido 202 puede incluir tanto marcador como sondas de captura utilizadas en el ensayo que pueden unirse específicamente a un analito diana. El dispositivo integrado 200 incluye las cámaras superior e inferior, el dispositivo de recogida de muestras y el bloqueo de tipo Luer 206 que bloquea el dispositivo de flujo lateral para el suministro de la mezcla de reacción para la posterior detección. Además, tal como se indica la cámara superior puede estar concebida con un bulbo 205 depresible (por ejemplo, de plástico) de modo que si se desea se aplica presión adicional para forzar el flujo de fluido desde una cámara superior hasta una cámara inferior.

En una forma de realización, la cámara superior comprende una válvula que permite una liberación controlable de una disolución comprendida en la cámara superior. Por ejemplo, cuando la válvula es una válvula de presión, el usuario aplica fuerza al vástago de la válvula para romper el vástago, mediante lo cual la característica desmontable permite que el tampón entre en la cámara inferior mediante el vástago. Además, la cámara sellada puede ser un bulbo flexible, que puede comprimirse (por ejemplo, el usuario aplica presión al bulbo), controlando por tanto la velocidad de flujo de la disolución (por ejemplo, tampón) hasta el instrumento de toma de muestras.

En algunas formas de realización, la cámara superior está compuesta por un componente de bulbo que es un compartimento autocontenido que incluye una disolución. Tales disoluciones incluyen disoluciones de extracción, de lisis, de reactivos, tampón o de conservantes. En una forma de realización, la disolución es una disolución tampón que se utiliza para transferir la muestra biológica desde el instrumento de toma de muestras hasta la cámara inferior.

Además, una cámara superior de este tipo puede comprender uno o más compartimentos, tal como se representa en la figura 5. Cada compartimento puede comprender una disolución que es la misma o diferente de 501 y 502.

Además, tales disoluciones pueden comprender reactivos según se desee comprendiendo de manera no limitativa

tampones de extracción, agentes reductores, agentes inmunorreactivos, tales como, agentes de unión específica antianalito que comprenden marcadores de detección (por ejemplo, conjugados) y restos de captura. Los reactivos para las reacciones se representan en 503 y 504 que muestran la fijación del Luer a la tira de prueba 505.

En otra divulgación, el conjunto de toma de muestras no está integrado con la carcasa que contiene un tubo de recepción de muestras. Véase la figura 6. En una configuración de este tipo, el conjunto 601 de toma de muestras se utiliza para recoger y suministrar una muestra a una cámara de recepción de muestras 609. La cámara de recepción de muestra puede abrirse o cerrarse para permitir que se introduzca una muestra en el tubo de recepción de muestras. Debe apreciarse que cualquier tubo de recepción de muestras dado a conocer en la presente memoria puede ser de una variedad de conformaciones geométricas, incluyendo cilíndrica, cuadrada, triangular o cualquier poligonal, según se desee. En algunas formas de realización, la carcasa puede comprender una o más aberturas sellables 603 que pueden abrirse para añadir uno o más reactivos seleccionados 607, tampones o fluidos de lavado.

Por ejemplo, en una divulgación, se extrae sangre completa en la cámara de recepción de muestras 609. Posteriormente, la muestra pasa a través de una membrana 602 (por ejemplo, una membrana para separar los glóbulos rojos del plasma, que permite que el plasma pase a su través) a una parte inferior del tubo de recepción de muestras para mezclarse con diversos reactivos, por ejemplo, necesarios para un inmunoensayo. Los inmunorreactivos, necesarios para seleccionar como diana analitos específicos, pueden preseleccionarse y disponerse como un sustrato sólido 607 en el SCD o añadirse a través de una abertura 603, o pueden disponerse en una membrana 604.

A medida que se descarga la sangre completa, la membrana 604 puede actuar como filtro para impedir el paso de componentes sanguíneos, permitiendo así que sólo pase plasma a través del extremo distal del tubo de recepción de muestras 605, que se ajustará en el dispositivo de prueba 606. Las válvulas adicionales que pueden utilizarse incluyen una válvula rotatoria, rompible, de paso, de compuerta, de bola, de charnela, de aguja, de mariposa, de pinza, de fuelle, de pistón, de corredera, de tapón, de desviador o de accionador. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "sonda de captura" se refiere a un conjugado de un agente de unión unido a un resto de captura y una "sonda de detección" se refiere a un conjugado de un agente de unión unido a un marcador o resto que produce una señal, en el que cada uno puede unirse específicamente a un analito diana. Además, por claridad, una "pareja de resto de captura" en el contexto del dispositivo de prueba (descrito a continuación) se refiere a una molécula complementaria, relacionada o compañera que se une específicamente a un resto de captura comprendido en una sonda de captura.

Los componentes de reactivos sólidos incluyen, un polvo, una píldora, un lecho, un gránulo liofilizado, un polvo liofilizado prensado, secado sobre un soporte (por ejemplo, perla de vidrio/plástico), liofilizado sobre o en asociación con un soporte sólido o secado directamente en la cámara inferior o de mezclado. Tales reactivos se conocen en la técnica tal como se da a conocer en CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, John E. *et al.*, eds. 1999).

En alguna divulgación, a medida que la disolución pasa a través del instrumento de toma de muestras, se produce una etapa de extracción de una muestra (por ejemplo, cuando la disolución incluye un tampón de extracción). Además, la cámara inferior puede comprender un filtro a través del cual fluye una muestra extraída. Por ejemplo, si está dispuesto un filtro en el extremo proximal de la cámara inferior, entonces una muestra extraída fluye a través de un filtro (por ejemplo, un disco de tela metálica) impidiendo de ese modo que determinados componentes de la mezcla de extracción pasen al compartimento de área de reactivos que comprende una perla de reactivo sólido. Además, unos medios de filtro también puede funcionar conteniendo la perla de reactivo durante el transporte y almacenamiento del SCD. Tal como se indica en la presente memoria, la perla de reactivo puede comprender la sonda de tanto detección como captura, o dos perlas separadas pueden contener cada una sondas de detección o captura.

El aspecto de filtración permite que un analito de interés migre a través del dispositivo de una manera controlada con pocas, si acaso algunas, sustancias interferentes. El aspecto de filtración, si está presente, proporciona a menudo una prueba que presenta una probabilidad de éxito superior, dependiendo del tipo de muestra que está procesándose, tal como resultaría evidente para un experto en la materia (por ejemplo, muestra de sangre completa frente a hisopo de garganta). En otra forma de realización, el SCD también puede incorporar reactivos útiles para evitar la reactividad cruzada con analitos no diana que pueden existir en una muestra y/o para condicionar la muestra; dependiendo de la forma de realización particular, estos reactivos pueden comprender de manera no limitativa bloqueantes distintos de hCG, reactivos anti-RBC, tampones a base de Tris, EDTA, entre otros. Cuando se contempla la utilización de sangre completa, se utilizan frecuentemente reactivos anti-RBC. Aún en otra forma de realización, el SCD puede incorporar otros reactivos tales como elementos de unión específica auxiliares, reactivos de pretratamiento de muestras de fluidos y reactivos que producen una señal (por ejemplo, sustratos necesarios para la reacción con conjugados de marcador).

En otra divulgación, la cámara inferior puede comprender un elemento de pequeño de papel absorbente, sobre el que se retiene un porcentaje predeterminado de la muestra extraída para fines de archivo. Tras hacer pasar a través del dispositivo de recogida y presentar una parte contenida para fines de archivo, la muestra extraída entra en

contacto con un sólido o una disolución de reactivo (por ejemplo, perla 202 de conjugado), y la siguiente etapa del ensayo tiene lugar a medida que el líquido de muestra disuelve rápidamente la perla de conjugado y permite que los reactantes se mezclen y comience el ensayo.

En otra divulgación, el Luer 105 dispuesto en el extremo distal del SCD puede reemplazarse por o fijarse adicionalmente a una estructura de válvula que también funciona controlando el flujo de líquido hacia fuera del dispositivo de recogida de muestras. También puede utilizarse una válvula en la puesta en práctica de la invención, cuando la válvula está dispuesta en la cámara sellada superior, proporcionando por tanto unos medios para controlar la liberación de las disoluciones contenidas en la misma. Ya esté en la cámara superior, la cámara inferior o entre cualquier compartimento dispuesto en el SCD, una válvula puede ser de cualquier tipo tal como se reconoce en la técnica tal como, pero sin limitarse a, una válvula rotatoria, de presión, rompible, de paso, de compuerta, de bola, de aguja, de mariposa, de pinza, de fuelle, de pistón, de corredera, de tapón, de desviador o de accionador. En una realización, la válvula es una válvula de presión que se abre cuando se ejerce presión en la parte de vástago de la válvula que se extiende en el interior de la cámara sellada superior (100), abriendo de ese modo por rotura el vástago hueco 102 y permitiendo que el contenido de la cámara superior sellada fluya al interior del tubo hueco, en el extremo del cual está dispuesto un instrumento de toma de muestras (por ejemplo, hisopo 107).

En una divulgación está prevista una válvula en el extremo distal del SCD. Cuando la válvula está en la posición cerrada, puede retenerse una muestra o una muestra y un reactivo en la cámara inferior 104. Cuando la válvula está en la posición abierta, puede liberarse el contenido de una subcámara de mezclado, por ejemplo mediante flujo por gravedad. Alternativamente, se utiliza el componente de bulbo del dispositivo de recogida de muestras para liberar la muestra/reactivo del Luer, Luer-válvula o válvula. En una forma de realización preferida de la presente invención, el contenido del extremo distal o de salida del dispositivo de recogida de muestras ("SCD") se libera del SCD de manera que el flujo puede accionarse, regularse o modularse.

En otra forma de realización, el extremo distal del SCD está abierto, por lo cual antes de la liberación de una disolución de la cámara sellada superior, el SCD se engancha (por ejemplo, mediante ajuste por fricción) en el orificio de recepción de un dispositivo de prueba. En una forma de realización de este tipo, el flujo de fluido desde el extremo distal del SCD al interior del dispositivo de prueba no está regulado por un Luer o una estructura de válvula. En otra divulgación; el extremo distal del SCD no utiliza una válvula sino que en su lugar está abierto. El SCD puede fijarse al dispositivo de prueba antes de la liberación del tampón desde la cámara superior. Tras la liberación de la disolución desde la cámara superior, se libera y/o se extrae la muestra del instrumento de recogida mediante la disolución y se mezcla con los reactivos ubicados en la cámara inferior. La mezcla fluye entonces al dispositivo de prueba para el análisis de la presencia de uno o más analitos. El posible incluir membranas que pueden disolverse con agua dentro de la cámara inferior para ralentizar el flujo de la mezcla fuera del SCD sobre el dispositivo de prueba. Tales membranas son convencionales y pueden estar diseñadas para permitir la retención de la mezcla durante periodos de tiempo diferentes suficientes para permitir el mezclado y la reacción de los reactivos y los analitos de la muestra. Por ejemplo, tales membranas pueden prepararse a partir de proteínas, polisacáridos o formadores de película.

En otra divulgación, el extremo distal de un SCD comprende una abertura muy estrecha que evita el flujo de fluido a menos que y hasta que se aplique presión al dispositivo (por ejemplo, mediante la estructura de bulbo del SCD, o si la carcasa es depresible, entonces ejerciendo presión sobre la propia carcasa) para forzar el fluido fuera del extremo distal. En otras palabras, no se encuentra válvula de ninguna clase dispuesta en el extremo distal del SCD.

En otro aspecto de la presente invención, los medios reguladores de fluido (por ejemplo, Luer 105, combinación de Luer-válvula y válvula) están cerrados de manera que la muestra o la muestra y uno o más reactivos pueden retenerse en la cámara inferior 104 durante cualquier periodo de tiempo. Entonces, la estructura de válvula puede abrirse mecánica, completa o parcialmente, para liberar el contenido a través del extremo distal o de salida del SCD al interior de un dispositivo de prueba, opcionalmente a una velocidad regulada o modulada.

Los reactivos utilizados en un SCD de la invención pueden incluir una o más sales, quelantes, anticoagulantes, detergentes, estabilizadores, diluyentes, agentes de tamponamiento, enzimas, cofactores, miembros de unión específica, marcadores, mucolíticos y similares. Dichos uno o más reactivos pueden ser compuestos que facilitan el análisis de una muestra. Además, tales reactivos pueden adaptarse fácilmente para su utilización en un dispositivo de prueba de la invención.

En una divulgación, el SCD se engancha a un segundo dispositivo, por ejemplo el dispositivo de prueba de la presente invención, de manera que abriendo la estructura de válvula o retirando un tapón 106 que cubre la abertura (no la válvula) se libera el contenido al interior del segundo dispositivo. En otra forma de realización, el enganche del SCD que comprende un Luer macho al dispositivo de prueba que comprende un Luer hembra da como resultado la liberación del contenido de la subcámara de reacción. En una forma de realización adicional, el contenido del extremo distal puede liberarse mediante el componente de bulbo. Cuando se utiliza una estructura de válvula en el SCD, la estructura de válvula puede abrirse para liberar el contenido mediante diversos medios tales como, pero sin limitarse a, abriendo una llave de paso o girando, rotando, torciendo o deslizando la estructura de válvula de manera que la válvula puede abrirse para permitir la comunicación fluidica al interior de la plataforma de prueba o eliminando

un tapón que abre la trayectoria de flujo de fluido.

Muestra de archivo. En un aspecto de la divulgación, están previstos unos medios para archivar una parte de una muestra. En algunas formas de realización, un dispositivo de prueba o SCD, o ambos, comprenden unos medios de archivo, que pueden comprender un sustrato absorbente o adsorbente (por ejemplo, papel o membrana), un tubo capilar corto de longitud definida o un pequeño depósito/compartimento para retener una parte de la muestra en la cámara inferior. En algunas formas de realización, este mecanismo de archivo está ubicado en una posición en el dispositivo antes de que la muestra se encuentre con los reactivos de reacción.

En una divulgación mostrada en la figura 28, un pequeño compartimento, que puede proporcionar un pequeño depósito para una muestra de archivo, 1109, está colocado en el dispositivo de prueba adyacente al orificio/abertura 1108 para el suministro de muestra al dispositivo de prueba. Un compartimento de archivo de este tipo puede estar configurado para poder retirarse o para que un sustrato sobre el que está dispuesta la muestra de archivo pueda retirarse el mismo de dicho compartimento. Por ejemplo, un material de filtro/membrana dimensionado para ajustarse al compartimento funcionará recogiendo una capacidad predeterminada de muestra (por ejemplo, célula, componentes celulares, proteína, ácido nucleico, etc.). El dispositivo de prueba puede contener una bolsa 1106 de tampón de lavado con una carcasa o cubierta 1107

En otra divulgación, un SCD comprende unos medios para retener una muestra de archivo, figura 29A. Por ejemplo, dentro del compartimento inferior de un SCD, pueden proporcionarse membranas hidrófobas y papel de filtro configurados para retener una muestra para fines de archivo. Son posibles diversas combinaciones de materiales. En una forma de realización, los medios para archivar comprenden tres discos 1203, 1206, 1207, que pueden tocarse o no unos con otros. En otra forma de realización, el SCD de la figura 29A puede estar configurado con manguitos 1202 que proporcionan unos medios para cambiar los tamaños del tubo/armazón más próximos al hisopo 1205 fijado al vástago 1201 de modo que a medida que sale un fluido del hisopo estará en proximidad estrecha con el hisopo, para mejorar la eficacia de extracción de fluido del hisopo. Se representa una perla de reactivo como 1208 y el orificio de salida es 1204.

Tal como se muestra en la figura 29B, los discos pueden comprender una parte de rejilla 1210 y una parte de lecho 1209, en los que la parte de lecho está diseñada para retener una muestra de archivo. La parte de lecho puede estar compuesta por cualquier material absorbente/adsorbente y puede comprender el 5, el 10, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 45 o el 50% del área de superficie de un disco. Además, la parte de rejilla puede comprender sustratos tridimensionales ("3D") elevados en relación con la superficie de un disco. Tales salientes 3D pueden proporcionar una rejilla en la que puede disponerse una perla de reactivo. Tales perlas pueden medir en tamaño de desde aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4, 4,5, 5,0, 5,5 hasta aproximadamente 6,0 mm.

En una divulgación, el material archivado es una(s) célula(s) o componente celular, incluyendo pero sin limitarse a una proteína, un péptido, un fragmento de proteína o una molécula de ácido nucleico. Por tanto, pueden conservarse muestras para pruebas adicionales dependiendo del tipo de molécula archivada (por ejemplo, proteína frente a ácido nucleico). Además, los discos de archivo 1207 (por ejemplo tal como se muestran en la figura 29A) proporcionan un medio de almacenamiento de muestras y mantienen la estabilidad de dichas muestras desde aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21 hasta 30 días. Por ejemplo, el ARN es estable durante aproximadamente 2, 3, 4 o 5 días.

En otra divulgación, los discos de archivo se colocan en una disolución de conservante, que prolonga el tiempo de almacenamiento para dichas muestras de archivo desde aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas. Por supuesto, dependiendo del entorno en el campo, puede almacenarse muestras indefinidamente (por ejemplo, una vez que la muestra se somete a congelación).

En otra divulgación, puede retirarse un compartimento de reacción en la cámara inferior del tubo de recepción de muestras y colocarse en una carcasa (por ejemplo, tubo de plástico). En una forma de realización, el compartimento (por ejemplo, una jaula) retiene un pequeño volumen de mezcla de muestra a la que puede añadirse conservante para su almacenamiento. En otra forma de realización, las disoluciones proporcionadas en la cámara superior o una disolución de reacción en la cámara inferior también pueden incluir conservantes necesarios para archivar una muestra líquida. Tales conservantes se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente US RE29061; Buccholz *et al.* Transfusion. Septiembre de 1999; 39(9):998-1004; Quiagen specialty reagents, disponible en Quiagen.com

En una divulgación, se retiene una muestra de archivo para pruebas posteriores (por ejemplo, mediante RT-PCR, véase el ejemplo 8).

Identificación de la muestra. El SCD también incluye en cualquier parte en el instrumento de toma de muestras o el tubo de recepción de muestras, por ejemplo, fijado al tubo externo 103, 3 etiquetas de identificación idénticas (por ejemplo, códigos de barras que permiten al menos 10^9 valores únicos) para el número de identificación de pacientes. Las etiquetas pueden desprenderse y ser autoadhesivas. Se retiene una etiqueta sobre el SCD 103. Las etiquetas desprendibles pueden colocarse sobre el dispositivo de prueba de la figura 3 y sobre cualquier documentación de

centro, o unos medios de depósito de archivo. El formato de código de barras será un estándar universal tal como Codabar 303 o 305. En otras formas de realización, las etiquetas de identificación pueden ser transpondedores que emiten señales conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, emisor de radiofrecuencia, emisor de luz o emisor de ondas electromagnéticas.

Compartimentos en las cámaras superior o inferior. En algunos aspectos de la invención, el SCD comprende uno o más compartimentos en la cámara inferior que pueden incluir reactivos, filtros, membranas y depósitos. En una forma de realización, la cámara superior del SCD puede comprender uno, dos o más compartimentos, cada uno de los cuales puede contener además una disolución. En algunas formas de realización, tales compartimentos pueden comprender el mismo o dos disoluciones, reactivos, tampones diferentes o una combinación de los mismos. Además, pueden disponerse múltiples compartimentos en serie en una cámara inferior (por ejemplo, múltiples jaulas en serie). Además, tales compartimentos pueden denominarse "subcompartimento" o "subcompartimentos" en las divulgaciones en la presente memoria.

En una divulgación, el compartimento es distal en relación con un instrumento de toma de muestras y comprende un componente de reactivo líquido o sólido que comprende agentes de unión que son específicos para un analito particular (o tipo de analito). Por ejemplo, el componente de reactivo líquido o sólido incluye un agente de unión específica (por ejemplo, anticuerpo) que puede unirse específicamente a un analito que puede estar presente en una muestra. En algunas formas de realización, se utiliza un único compartimento de reacción o mezclado en el SCD que es distal a y está en comunicación fluidica con el instrumento de toma de muestras. En otras formas de realización, pueden utilizarse uno o más compartimentos funcionando un compartimento como cámara de lisis o extracción, mientras que un segundo compartimento distal al primer compartimento funciona como cámara de mezclado de reactivo-muestra. En formas de realización adicionales, pueden disponerse medios de filtración en el extremo proximal de uno o más compartimentos, compartimento(s) que está(n) dispuesto(s) distal(es) en relación con los instrumentos de toma de muestras. Pueden utilizarse medios de filtro para eliminar determinados componentes de la muestra, antes de la extracción/lisis, el mezclado de la muestra-reactivo, durante el procesamiento o antes de la liberación del SCD. Además, pueden disponerse los mismos o diferentes medios de filtración en múltiples compartimentos si tales múltiples compartimentos están presentes en el tubo de recepción de muestras.

Muestras.

Una muestra es cualquier material que va a someterse a prueba para determinar la presencia y/o concentración de un analito. En general, una muestra biológica puede ser cualquier muestra tomada de un sujeto, por ejemplo, animal no humano o ser humano y utilizada en los dispositivos de prueba. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser una muestra de cualquier líquido corporal, célula o muestras de tejido de una biopsia. Las muestras de líquidos corporales pueden incluir sin ninguna limitación sangre, orina, esputos, semen, heces, saliva, bilis, líquido cerebral, hisopo nasal, hisopo urogenital, aspirado nasal, líquido espinal, etc. Las muestras biológicas también pueden incluir cualquier muestra derivada de una muestra tomada directamente de un sujeto, por ejemplo, un ser humano. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser la fracción de plasma de una extracción de muestra de sangre, suero, proteína o ácido nucleico de las células o los tejidos recogidos o de una muestra que se ha tratado de un modo para mejorar la detectabilidad de la muestra, por ejemplo, un tampón de lisis que contiene un agente mucolítico que descompone la mucosidad en una muestra nasal reduciendo significativamente la viscosidad de la muestra y un detergente para lisar el virus liberando de ese modo antígeno y haciendo que estén disponibles para su detección mediante el ensayo. Una muestra puede ser de cualquier sujeto animal, incluyendo pero sin limitarse a, ser humano, ave, porcino, equino, bovino, murino, gato, perro u oveja.

Por ejemplo, puede derivarse una muestra de cualquier fuente, tal como un líquido fisiológico, incluyendo sangre, suero, plasma, saliva o líquido oral, esputos, líquido de la lente ocular, líquido nasal, hisopo o aspirado nasofaríngeo o nasal faríngeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, moco, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, líquido cefalorraquídeo, semen, moco cervical, secreciones vaginales o uretrales, líquido amniótico, y similares. En la presente memoria, los homogenados de líquidos de tejidos celulares tales como, por ejemplo, raspados de uñas, piel y cabello y extractos de carne también se consideran líquidos biológicos. El tratamiento previo puede incluir la preparación de plasma a partir de sangre, diluir o tratar líquidos viscosos, y similares. Los procedimientos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, separación, concentración, inactivación de componentes interferentes y la adición de reactivos. Además de líquidos fisiológicos, pueden utilizarse otras muestras tales como agua, productos alimenticios, extractos de suelo, y similares para la realización de ensayos industriales, medioambientales o de producción de alimentos así como ensayos de diagnóstico. Además, puede utilizarse un material sólido que se sospecha que contiene el analito como muestra de prueba una vez que se modifica para formar un medio líquido o para liberar el analito. La selección y el tratamiento previo de muestras biológicas, industriales y medioambientales antes de someter a prueba se conocen bien en la técnica y no es necesario que se describan adicionalmente.

Otros campos de interés incluyen el diagnóstico de enfermedades veterinarias, el análisis de carne, aves de corral, pescado para determinar la contaminación bacteriana, la inspección de plantas de alimentos, restaurantes, hospitales y otras instalaciones públicas, el análisis de muestras medioambientales incluyendo agua para determinar

la contaminación de playas, océanos, lagos o piscinas. Los analitos detectados mediante estas pruebas incluyen antígenos virales y bacterianos así como productos químicos incluyendo, por ejemplo, plomo, pesticidas, hormonas, fármacos y sus metabolitos, hidrocarburos y todas las clases de compuestos orgánicos e inorgánicos.

5 DISPOSITIVO DE PRUEBA

La presente divulgación proporciona un dispositivo de prueba, particularmente dispositivos de inmunoensayo, para determinar la presencia o ausencia de múltiples analitos en una muestra de fluido. En general, un dispositivo de prueba de la figura 3 de la presente divulgación incluye una matriz que define una trayectoria de flujo axial. Normalmente, la matriz incluye además una zona de recepción de muestras, una o más zonas de prueba y una o más zonas de control. En formas de realización frecuentes, una zona de prueba comprende las zonas de control y prueba, que son conjuntamente líneas referenciables.

Tal como se utiliza en la presente memoria en el contexto del dispositivo de prueba, los términos “membrana de flujo axial”, “membrana de flujo lateral”, “membrana de prueba”, “tira de prueba” o “matriz” se utilizan de manera intercambiable que emplea la acción capilar para mover o transportar fluidos de prueba o emplea el movimiento de fluido separado de la acción capilar a medida que se bombea fluido mediante la acumulación de presión de gas, presión hidráulica (bombeo directo utilizando una bomba de pistón o rotatoria, de fuelle u otro tipo de bomba sobre los fluidos de ensayo, movimiento electrostático debido a un campo eléctrico, gravedad, etc.).

En un aspecto de la invención, el dispositivo de prueba tal como se representa en la figura 3 está compuesto por una abertura/orificio en el que se engancha el extremo distal de un SCD de la invención o bien mediante una frita de fricción, un bloqueo de tipo Luer, un adaptador o bien una válvula. Una abertura/punto de acceso 302 proporciona una abertura a través de la cual una muestra del SCD fluye al interior del dispositivo de prueba. Puede disponerse una membrana de separación de sangre en el orificio que proporciona flujo en un sentido. En otra forma de realización, también puede disponerse una membrana de este tipo en el SCD (por ejemplo, inmediatamente distal al instrumento de hisopo de muestra).

Está dispuesto aguas arriba de la abertura un compartimento 307 que puede estar en comunicación fluidica con la abertura, abertura que está en comunicación fluidica con un sustrato absorbente 309. Además, el compartimento puede comprender uno o más subcompartimentos 308 que contienen una o más disoluciones. Los subcompartimentos en el contexto del dispositivo de prueba pueden estar realizados en un material de tipo vejiga perforable, punccionable, rompible (por ejemplo, ampolla) o depresible. En una forma de realización, el casquillo se desprende, sin embargo, el tampón se libera sólo una vez que se aplica fuerza adicional al compartimento de tampón/lavado 308. Tal como se indica en la presente memoria, tales compartimentos pueden manipularse aplicando presión para punccionar, romper o deprimir el compartimento suficientemente como para liberar su contenido. Además, tales compartimentos pueden perforarse mediante una lanceta, un punzón o un apéndice que se introduce en dicho compartimento tras ejercer fuerza (por ejemplo, presionando con el pulgar) sobre dicho compartimento.

En una forma de realización, el dispositivo de prueba comprende dos secciones, en el que una sección comprende una parte en la que se aplica una muestra 302 y un compartimento aguas arriba de la parte en la que se aplica la muestra que comprende un tampón 308 de lavado o ejecución. En otra forma de realización, la sección aguas arriba puede comprender uno o más (por ejemplo, dos) compartimentos que pueden contener el mismo o diferentes tampones, en el que cada compartimento puede manipularse por separado o simultáneamente para expulsar su contenido.

En otra forma de realización, el propio compartimento 307 puede ser semirrígido, plegable o depresible, o de tipo vejiga, lo que proporciona unos medios para compactar el compartimento para expulsar cualquier contenido en el mismo. Por tanto, en algunas formas de realización, un usuario puede ejercer presión sobre el compartimento 307 lo que dará como resultado que el contenido en el mismo, ya esté autocontenido o contenido en un subcompartimento, se libere al sustrato de mecha 309. Una disolución de este tipo puede funcionar como tampón de lavado o de captación, movilizándolo o potenciando la movilización de la mezcla de muestra procesada a través del lecho absorbente hacia la tira de prueba 310. Generalmente, tales disoluciones líquidas pueden comprender tampón de lavado, solución salina o cualquier disolución deseada. Además, en algunas formas de realización, una disolución de este tipo puede comprender reactivos, enzimas, marcadores o compuestos químicos. El tampón de lavado moviliza cualquier marcador no unido haciendo que se desplace a lo largo de la tira pasando por la zona de detección reduciendo por tanto el fondo.

Además, aguas abajo de la tira de prueba 310 está dispuesto un sustrato absorbente 311. El sustrato de la membrana de prueba puede solaparse o hacer tope con uno o tanto el sustrato de mecha como el sustrato absorbente, respectivamente. Además, en algunas formas de realización, el dispositivo de prueba superior 306 o la carcasa inferior 312 puede comprender etiquetas de identidad 303 y 305, que identifican y se corresponden con una etiqueta de identidad idéntica en el SCD y también puede identificar el número del dispositivo de prueba (por ejemplo, para fines de seguimiento y garantía de calidad). La ventana 304 a través de la carcasa superior permite la visualización y lectura de los resultados.

En una forma de realización relacionada, la matriz incluye además una zona absorbente dispuesta aguas abajo del sustrato de flujo lateral, membrana o matriz. En una forma de realización, puede estar dispuesto un lecho de mecha aguas arriba de la membrana de flujo lateral. En otra forma de realización, está dispuesto un lecho de mecha directamente por debajo de la abertura de entrada de muestras. Además, en formas de realización preferidas, la región de prueba, que comprende las zonas de prueba y de control, puede apreciarse, figura 8.

Los materiales adecuados para fabricar los sustratos absorbentes 311 comprenden de manera no limitativa materiales o lechos de polietileno hidrófilos, fibra acrílica, fibra de vidrio, papel de filtro o lechos, papel desecado, pulpa de papel, material textil, y similares. Por ejemplo, la zona absorbente de la membrana de flujo lateral puede estar compuesta por un material tal como una fibra acrílica hidroligada no tejida, es decir, material New Merge (disponible de DuPont) o HDK (disponible de HDK Industries, Inc.), polietileno no tejido tratado para mejorar la propiedad hidrófoba del material.

Medios de seguridad. En alguna divulgación, se disponen unos medios 301 de seguridad sobre la cámara depresible 307 de modo que el contenido de la cámara no puede descargarse accidentalmente al canal en comunicación fluidica con la membrana de flujo lateral. Unos medios de seguridad pueden ser una cubierta o pestaña que se eleva o se echa hacia atrás para exponer la cámara depresible o un botón pulsador dispuesto sobre la misma.

Además, unos medios de seguridad de este tipo pueden funcionar como adaptador para una válvula, Luer o adaptador relacionado específico presente en el extremo distal del SCD. Por tanto, unos medios de seguridad pueden cubrir una abertura en la que se engancha el extremo distal del SCD, por ejemplo, antes de la liberación de una muestra al interior del dispositivo de prueba. En una forma de realización adicional, el lector está diseñado de modo que sólo puede insertarse un dispositivo de prueba en un orificio de recepción si se retira en primer lugar la cubierta de seguridad. Por ejemplo, un dispositivo de prueba con su cubierta de seguridad retirada indica que se ha introducido una muestra en el dispositivo de prueba y que se ha liberado tampón de ejecución desde el compartimento 307 aguas arriba de la abertura (adaptador/cubierta de seguridad). En una divulgación, la abertura está dispuesta por encima del lecho de mecha 309.

Medios de huecos. En alguna divulgación, un dispositivo de prueba comprende un hueco dispuesto entre la membrana de flujo lateral (por ejemplo, lecho de mecha) y el canal en comunicación fluidica con el depósito de tampón. El hueco funciona manteniendo cualquier disolución contenida en el depósito de botón pulsador y muestra de ensayo separadas hasta el tiempo apropiado según el desarrollo del ensayo, figura 7. En alguna divulgación, el hueco puede ser de aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mm. En una divulgación, el hueco es mayor de cero y menor de 3 mm. Por tanto, cuando un usuario ejerce presión sobre el compartimento, aguas arriba de la abertura de muestras, se fuerza que el hueco mostrado en 703 y 704 se cierre y una disolución contenida en el compartimento fluye en la dirección mostrada por 701 hasta y a través del lecho de mecha, movilizandopor tanto la muestra a través de la tira de prueba. Tal como se indicó anteriormente, la disolución puede comprender cualquier tampón, reactivo, compuesto químico, tinte, marcador o perla deseado. Debe apreciarse que las formas de realización de huecos dadas a conocer en la presente memoria pueden adaptarse a cualquiera de las configuraciones de dispositivo de prueba dadas a conocer en la presente memoria.

En una divulgación, el dispositivo de prueba es una tira de prueba de flujo lateral, preferentemente, aunque no necesariamente, encerrada en una carcasa, diseñada para leerse mediante el lector, figuras 3, 27.

En una divulgación mostrada en la figura 27 A, B, y C, se introduce una muestra procesada mediante el SCD en el dispositivo de prueba 1001, posteriormente se libera un tampón de captación o ejecución y sigue a la muestra a través del lecho de mecha y hacia la tira de prueba 1003, en la que agentes de captura con patrones específicos se unen a sus sondas de captura compañeras. Por tanto, si está presente un analito particular, se unirá a una sonda de detección y sonda de captura (tal como se describió anteriormente en la presente memoria), sonda de captura que se unirá a su resto de captura compañero específico inmovilizado sobre manchas o líneas definidas en la tira de prueba 1003. La figura 27B muestra los componentes del dispositivo de prueba que incluye la carcasa superior 1002, carcasa inferior 1004 y abertura 1005.

En una divulgación, está comprendida una disolución de lavado/ejecución en un paquete de tipo lámina metálica, bolsa o blíster (por ejemplo, similar a un paquete de ketchup/condimento) que está dispuesto en el dispositivo de prueba aguas arriba, figura 27C, del orificio de entrada de muestras 302, 504, 605, 1005, 1108. La bolsa o paquete puede estar diseñado de modo que sea simétrico alrededor de dos ejes ortogonales de modo que pueda cargarse en el dispositivo de prueba fácilmente. Por tanto, en una forma de realización, la cubierta del dispositivo de prueba dispuesta sobre el paquete, cuando se presiona, puede hacer que se rompa el paquete liberando el contenido del mismo.

En otra divulgación, la parte de botón puede comprender un apéndice perforador que punciona el paquete a medida que se presiona el botón liberando por tanto el contenido del mismo. Un resorte de hojas o resorte en voladizo, figura 27C, puede reposar entre el paquete y el botón y da como resultado que la presión ejercida sobre el paquete garantiza que todo el contenido se libera. Además, la geometría del dispositivo de prueba está configurada de modo

que el tampón de lavado se dirige hacia el lecho de mecha 904/905, 1006. Además, la geometría del botón, el resorte y la carcasa reduce los vacíos de aire en el área del paquete permitiendo que el tampón de lavado fluya en cualquier dirección, incluso contra la gravedad (por ejemplo, cuesta arriba), según sea necesario, pero no hacia atrás al interior del área de almacenamiento del paquete.

5 El número y tamaño de los orificios creados, así como la geometría del orificio creado pueden ajustarse en relación entre sí con el fin de permitir el flujo predeterminado del tampón de lavado fuera del paquete.

10 En una forma de realización, el apéndice punzonador (por ejemplo, aguja) proporcionará una barrera de resistencia al fluido en la parte superior del paquete, permitiendo que el fluido salga por la parte inferior del paquete en la dirección del lecho de mecha. La aguja punzonadora también puede ser de sección decreciente con el fin de lograr o potenciar esta función.

15 En una forma de realización, el resorte, figura 27C, está conformado de una sola pieza con el botón, carcasa superior o carcasa inferior, figura 27B, o puede ser un componente separado totalmente que está configurado para ajustarse fácilmente y sellar la cámara de tampón de lavado/ejecución.

20 En una divulgación, los lados del botón están diseñados para minimizar los puntos de compresión mientras se presiona el botón. Los lados también pueden estar diseñados para proporcionar una función de tipo deflector, minimizando el riesgo de que salga líquido del dispositivo de prueba.

25 En otra divulgación, la geometría de la característica que soporta el extremo de la tira de mecha está diseñada para permitir que la característica punzonadora (por ejemplo, aguja) pase a través del paquete y no permitir que el paquete forme un sello entre el paquete y la característica de soporte. La acción de la aguja perfora tanto el lecho de mecha como el paquete. En otra forma de realización, la punción es sólo del paquete con el lecho de mecha ubicado directamente adyacente al orificio perforado.

30 En una divulgación, el tampón de lavado/ejecución en el dispositivo de prueba está compuesto por un sustrato rompible/desgarrable (por ejemplo, una ampolla). La presión ejercida sobre una membrana de sellado o botón rompe la ampolla liberando por tanto su contenido. En una forma de realización, está diseñado un canal, canalón o depresión para dirigir el tampón hasta el lecho de mecha.

35 En una divulgación, la abertura para recibir el extremo distal del SCD comprende un casquillo desprendible ("casquillo de bloqueo") 1104 (figura 28A) que se fija al conjunto de SCD y se desprende del cuerpo del dispositivo de prueba 1105 a medida que se retira el SCD 1101, liberando por tanto el tampón de lavado o ejecución desde un compartimento/depósito 1102 aguas arriba o inmediatamente aguas arriba de dicha abertura. Aún en otra forma de realización, el casquillo de bloqueo, cuando se tuerce en la posición de bloqueo, permite que se dispense una muestra sobre el dispositivo de prueba mientras que se libera simultáneamente tampón o tampón de lavado desde un compartimento aguas arriba. Por ejemplo, el casquillo de bloqueo comprenderá una geometría de canales 1103, orificios o aberturas que se alinean con aberturas, canales u orificios del compartimento de lavado/tampón sólo cuando el collar está en la posición de bloqueo. Puede utilizarse un casquillo de bloqueo de este tipo con cualquiera del uno o más compartimentos aguas arriba 1102, 1106 que pueden utilizarse para suministrar un tampón/lavado o cualquier otro líquido.

45 En una divulgación alternativa, el SCD 1101 puede comprender el casquillo de bloqueo 1103 que se ajusta en el cuerpo del dispositivo de prueba 1103 y se tuerce desde una posición una posición de desbloqueo hasta una posición 1104 de bloqueo.

50 En una divulgación tal como se representa en la figura 28B, el compartimento de lavado/tampón aguas arriba comprende una membrana blanda (por ejemplo, paquete de conformado llenado sellado) o ampolla que se desgarr/rompe fácilmente tras ejercer una fuerza mínima (por ejemplo, presionando el usuario con el dedo). Un compartimento de piel de cebolla 1106 de este tipo puede estar cubierto adicionalmente por una cubierta 1107 desmontable dura que evita la rotura accidental de la piel de cebolla. La muestra entra en el dispositivo de prueba a través de un orificio 1109 y el dispositivo puede presentar un canal 1109 estrecho para la recuperación de una muestra de archivo.

60 Tal como se muestra en la figura 8, la muestra se suministra a la tira de prueba mediante el SCD 802 que incluye el vástago y el hisopo 806. Aguas arriba de la tira de prueba se encuentra el compartimento 801 con tampón de lavado u otro fluido. La tira de prueba incluye zonas de prueba 803 y zonas de control A, B, C 804. La sonda de detección, mediante el marcador de conjugado, proporcionará una señal detectable. El dispositivo de prueba se inserta entonces en un lector 400 tal como se muestra en la figura 4, en el que se mide y/o detecta la señal del marcador. En otra forma de realización, la tira de prueba 401 puede insertarse en una bandeja 402 movable en el lector tras haberse completado el periodo de procesamiento del ensayo corto durante un periodo de lectura muy corto (~20 segundos), esto permite un rendimiento mucho más alto de pruebas con un lector. Además, en otra forma de realización, la tira de prueba puede insertarse en el lector antes de la adición de la muestra.

65

En cualquiera de las divulgaciones en la presente memoria dirigidas a la liberación de un tampón de lavado/ejecución desde una cámara aguas arriba de la muestra (por ejemplo, orificio de entrada de muestras), puede configurarse una característica de retraso temporal en el dispositivo de prueba, de modo que pasa un periodo de tiempo entre la introducción de la muestra y la liberación del tampón de lavado/ejecución. Por ejemplo, un sustrato de lecho de mecha seco se hincha cuando se humedece (es decir, tras la liberación del tampón de lavado) y debido al hinchamiento conecta y desconecta de lo contrario la tira de mecha, figura 34. Por ejemplo, se aplica una muestra 1405. La ampolla o sustrato 1401 que comprende el tampón de lavado se rompe/desgarra liberando el líquido hacia la parte de lecho de mecha seco 1402, que se hincha 1403 y proporciona comunicación de líquido a la parte de lecho de mecha que contiene la muestra 1405. La muestra/tampón corre a través de la tira de prueba a través del lecho de mecha 1406.

En otra divulgación, se coloca una longitud/densidad predeterminada de membrana fibrosa entre el compartimento tampón de lavado compartimento y la membrana de mecha, membrana fibrosa que puede retrasar el contacto del tampón de lavado con la membrana de mecha, funcionando por tanto como un mecanismo de retraso temporal. El tampón empapa la membrana fibrosa y se acumula en el extremo de las fibras de la membrana hasta que alcanza la membrana de mecha y fluye a su través estando la muestra dispuesta sobre la membrana de mecha. En otra forma de realización, el tampón se acumula en los extremos de las fibras de la membrana hasta que existe un volumen suficiente para formar un puente en el hueco que separa la membrana fibrosa de la membrana de mecha.

En otra divulgación, está configurado un mecanismo de resorte o émbolo en el dispositivo de prueba, que funciona reduciendo el volumen del compartimento/ampolla, garantizando por tanto que el contenido en el mismo se dispersa sobre un lecho de mecha. El usuario puede mover un émbolo hacia delante ejerciendo presión sobre el botón o puede impulsarse hacia delante un émbolo accionado con resorte de una manera automática (por ejemplo, cuando se coloca en el lector). El émbolo forma un sello a medida que se impulsa hacia delante de modo que el único medio de salida del líquido es a través del lecho de mecha.

En una divulgación, el transporte de líquido a lo largo de la tira de prueba se basa en la acción capilar. En una forma de realización adicional, el transporte de líquido a lo largo de la matriz se basa en un flujo lateral no absorbente, en el que todos los componentes disueltos o dispersados de la muestra líquida se portan a velocidades sustancialmente iguales y con un flujo relativamente no alterado de manera lateral a través de la matriz, en contraposición a la retención preferente de uno o más componentes tal como se produciría, por ejemplo, en materiales que interaccionan química, física, iónicamente o de otra forma con uno o más componentes. Véase por ejemplo la patente US nº 4.943.522, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Puede utilizarse cualquier material adecuado para preparar los dispositivos dados a conocer en la presente memoria, incluyendo tal material un material rígido o semirrígido, no permeable al agua, tal como vidrio, cerámica, metales, plásticos, polímeros o copolímeros, o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, o bien el SCD o bien el dispositivo de prueba comprende un plástico, polímero o copolímero tal como los que son resistentes a la rotura, tales como polipropileno, polialómero, policarbonato o cicloolefinas o copolímeros de cicloolefina. Además, pueden prepararse dispositivos de la invención mediante procedimientos de fabricación apropiados, tales como, pero sin limitarse a, moldeo por inyección, moldeo por soplado, mecanizado o moldeo con prensa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, sustrato de la tira de prueba se refiere al material al que se une un resto de captura utilizando procedimientos convencionales en la materia. Pueden utilizarse una variedad de materiales como sustrato, incluyendo cualquier material que pueda actuar como soporte para la fijación de las moléculas de interés. Tales materiales los conocen los expertos en la materia y comprenden de manera no limitativa polímeros orgánicos o inorgánicos, polímeros naturales y sintéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, agarosa, celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, otros derivados de celulosa, dextrano, derivados de dextrano y copolímeros de dextrano, otros polisacáridos, vidrio, geles de sílice, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), rayón, nailon, polietileno, polipropileno, polibutileno, policarbonato, poliésteres, poliámidas, polímeros de vinilo, poli(alcoholes vinílicos), poliestireno y copolímeros de poliestireno, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similares, resinas acrílicas, acrilatos y ácidos acrílicos, acrilamidas, poliácridamida, combinaciones de poliácridamida, copolímeros de vinilo y acrilamida, metacrilatos, derivados y copolímeros de metacrilato, otros polímeros y copolímeros con diversos grupos funcionales, látex, caucho de butilo y otros cauchos sintéticos, silicio, vidrio, papel, esponjas naturales, proteína insoluble, tensioactivos, glóbulos rojos, metales, metaloides, materiales magnéticos u otros medios disponibles comercialmente o un material complejo compuesto por un sustrato sólido o semisólido recubierto con materiales que mejoran la propiedad hidrófila del sustrato de la tira, por ejemplo, poliestireno, Mylar, polietileno, policarbonato, polipropileno, polibutileno, metales tales como aluminio, cobre, estaño o mezclas de metales recubiertos con dextrano, detergentes, sales, PVP y/o tratados con descarga electrostática o de plasma para añadir carga a la superficie confiriendo así una propiedad hidrófila a la superficie.

En una divulgación, la membrana de flujo lateral está compuesta por un material poroso tal como material de lámina de polietileno de alta densidad fabricado por Porex Technologies Corp. de Fairburn, Ga., EE.UU. El material de lámina presenta una estructura de poro abierto con una densidad típica, a un volumen de vacío del 40%, de 0,57 g/cc y un diámetro de poro promedio de 1 a 250 micrómetros, siendo el promedio generalmente de desde 3

hasta 100 micrómetros. En otra forma de realización, la zona de marcador está compuesta por un material poroso tal como una fibra acrílica hidroligada no tejida (similar a la zona de recepción de muestras), por ejemplo, material New Merge o HDK. A menudo, el material poroso puede estar apoyado, o laminado sobre, una capa generalmente impermeable al agua, por ejemplo, Mylar. Cuando se emplea, la capa de apoyo se sujeta generalmente a la matriz mediante un adhesivo (por ejemplo, cinta adhesiva de doble cara 444 de 3M). Normalmente, se utiliza una capa de apoyo impermeable al agua para membranas de bajo grosor. Puede utilizarse una amplia variedad de polímeros siempre que no se unan de manera no específica a los componentes del ensayo y no interfieran con el flujo de la muestra de fluido. Los polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poliestireno y similares. En ocasiones, la matriz puede soportarse a sí misma. También pueden utilizarse otras membranas susceptibles de flujo no absorbente, tales como poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo), copolímeros de acetato de vinilo y cloruro de vinilo, poliamida, policarbonato, poliestireno, y similares. Aún en otra forma de realización, la membrana de flujo lateral está compuesta por un material tal como papel no tratado, combinaciones de celulosa, nitrocelulosa, poliéster, un copolímero de acrilonitrilo, y similares. La zona de marcador puede construirse para proporcionar un flujo o bien absorbente o bien no absorbente, frecuentemente el tipo de flujo es similar o idéntico al proporcionado en al menos una parte de la zona de recepción de muestras. En una forma de realización frecuente, la zona de marcador está compuesta por un material textil no tejido tal como rayón o fibra de vidrio. Otros materiales de la zona de marcador adecuados para su utilización por la presente invención incluyen los materiales cromatográficos dados a conocer en la patente US 5.075.078, que se incorpora a la presente memoria como referencia.

En una divulgación frecuente, el sustrato de la tira de prueba se trata con una disolución que incluye agentes estabilizadores de marcadores y de bloqueo de materiales. Los agentes de bloqueo incluyen albúmina sérica bovina (BSA), BSA metilada, caseína, caseína hidrolizada con ácido o base, leche desnatada en polvo, gelatina de pescado, o similar. Están fácilmente disponibles agentes estabilizadores y se conocen bien en la técnica, y pueden utilizarse, por ejemplo, para estabilizar reactivos marcados. En algunas formas de realización, el compartimento aguas arriba que contiene una disolución 307 puede comprender múltiples ampollas, que pueden punccionarse o romperse selectivamente para liberar su contenido. Por tanto, en una forma de realización, están contenidos agentes de bloqueo en una ampolla que se utiliza para tratar previamente (por ejemplo, "bloquear") la tira de prueba (es decir, membrana de flujo lateral), mientras que se reserva la ampolla adicional para lavar la muestra a través de la tira de prueba.

En diversas divulgaciones en la presente memoria, la tira de prueba/membrana de flujo lateral comprende múltiples zonas de prueba, proporcionándose a una de las cuales el número de referencia 803 en la figura 8. Las zonas de prueba contienen generalmente restos de captura preseleccionados, comprendiendo una zona preseleccionada restos de captura que son parejas para restos de captura conjugados con analito-agentes de unión específica, tales como anticuerpos monoclonales. En muchas de las formas de realización contempladas en la presente memoria, se incorporan múltiples tipos de reactivos marcados en el SCD de manera que pueden permear junto con una muestra de fluido con la que se ponen en contacto en el dispositivo. Estos múltiples tipos de reactivo marcado pueden ser reactivos de control o específicos de analito y pueden presentar diferentes características detectables (por ejemplo, diferentes colores) de manera que un reactivo marcado puede diferenciarse de otro reactivo marcado si se utiliza en el mismo dispositivo, o en una forma de realización preferida, que presenta diferentes restos de captura. Ya que los reactivos marcados se unen frecuentemente a un analito de interés específico y posteriormente se procesan a través de un dispositivo de prueba que comprende una tira de prueba, la detección diferencial de reactivos marcados que presentan diferentes especificidades (incluyendo reactivos marcados de control y específicos de analito) puede ser un atributo deseable. Sin embargo, frecuentemente, la capacidad para detectar de manera diferencial los reactivos marcados que presentan diferentes especificidades basándose en el componente de marcador solo no se debe necesariamente a la presencia de zonas de control y prueba definidas en el dispositivo, lo que permite la acumulación de reactivo marcado en zonas designadas.

En algunas formas de realización, cada sonda de detección está conjugada con un marcador fluorescente que emite una longitud de onda diferente. Por tanto, cuando una pluralidad de agentes de unión específica están comprendidos en un SCD, cuando la pluralidad comprende varios grupos diferentes de parejas de unión específica, cada pareja de unión para un grupo dado comprende marcadores diferentes de cualquier otro grupo, cuando los múltiples grupos constituyen la pluralidad de agentes de unión específica. Por ejemplo, puede conjugarse un grupo de anticuerpos de unión específica a virus de la gripe A con un tipo de marcador fluorescente (es decir, sondas de detección conjugadas con un primer marcador fluorescente), mientras que un grupo de anticuerpos de unión específica (es decir, sondas de detección conjugadas con un segundo marcador fluorescente), y un tercer, cuarto o quinto grupo puede comprender cada uno sondas de detección conjugadas con diferentes marcadores fluorescentes. Por supuesto, debe resultar evidente que las sondas de detección también pueden comprender una combinación de diferentes tipos de marcadores (por ejemplo, comprendiendo un primer grupo un marcador fluorescente, mientras que el segundo grupo comprende un metal, mientras que un control puede comprender un cromóforo). En una forma de realización, los marcadores fluorescentes emiten longitudes de onda que son suficientemente distintas como para que puedan diferenciarse varias líneas de prueba.

La presente descripción proporciona el desarrollo y la utilización de zonas de control individuales o múltiples en un único dispositivo de inmunoensayo que se colocan de una manera predeterminada en relación con zonas de prueba individuales permitiendo de ese modo una fácil identificación de cada uno del uno o más analitos de interés

sometidos a prueba en el dispositivo. La presente descripción proporciona además la preparación de zonas de control de diversas conformaciones, identidades físicas o químicas y colores. En parte, la utilización de tales zonas de control permite dispositivos de inmunoensayo que son fáciles de utilizar, y permiten la identificación de múltiples analitos durante un único procedimiento de ensayo. (Véase el ejemplo 11).

En una forma de realización, el dispositivo de prueba no incluye ningún reactivo contenido en el mismo que pueda unirse específicamente a un analito (por ejemplo, anticuerpo que es específico para H5N1).

La zona de prueba incluye generalmente una o más zonas de control que son útiles para verificar que el flujo de muestra es tal como se esperaba. Cada una de las zonas de control comprende una zona especialmente distinta que a menudo incluye un elemento inmovilizado de una pareja de unión específica que reacciona con un reactivo de control marcado. En una forma de realización ocasional, la zona de control del procedimiento contiene una muestra auténtica del analito de interés, o un fragmento del mismo. En esta forma de realización, puede utilizarse un tipo de reactivo marcado, en el que la muestra de fluido transporta el reactivo marcado hasta las zonas de control y prueba; y el reactivo marcado no unido a un analito de interés se unirá entonces a la muestra auténtica del analito de interés colocado en la zona de control. En otra forma de realización, la línea de control contiene un anticuerpo que es específico para, o por lo demás proporciona la inmovilización de, el reactivo marcado. En funcionamiento, se contiene un reactivo marcado en cada una de dichas una o más zonas de control, incluso cuando cualquiera o todos los analitos de interés están ausentes de la muestra de prueba.

En algunas divulgaciones, se introduce un reactivo de control marcado en el flujo de muestra de fluido o bien en el SCD o bien en el dispositivo de prueba. Por ejemplo, en el dispositivo de prueba, pueden incluirse reactivos de control en el depósito de disolución/tampón aguas arriba, que se describen en la presente memoria, figura 3. En otro ejemplo, el reactivo de control marcado puede añadirse a la muestra de fluido antes de que se aplique la muestra al dispositivo de prueba, por ejemplo, presente en la subcámara de mezclado en el SCD.

Las funciones ejemplificativas de las zonas y los reactivos de control marcados incluyen, por ejemplo, la confirmación de que el flujo de líquido de la muestra solubiliza y moviliza eficazmente los reactivos marcados del SCD, que se capturan en una o más zonas de prueba definidas. Además, los controles pueden confirmar que una cantidad suficiente de líquido se desplazó correctamente a través de las zonas de control y prueba de la tira de prueba, de manera que pudo reaccionar una cantidad suficiente de restos de captura con las correspondientes sondas de captura específicas complejadas con un analito específico (es decir, mediante el agente de unión específico de antígeno). Además, los reactivos de control confirman que los inmunocomplejos (por ejemplo, analito-agente de unión específico de analito) se desplazan sobre la zona de prueba que comprende las zonas de control y prueba, cruzan la(s) zona(s) de prueba en una cantidad tal que la acumulación del analito marcado produciría una señal visible o legible de otra forma en el caso de un resultado de prueba positivo en la(s) zona(s) de prueba. Además, una función adicional de las zonas de control puede ser actuar como zonas de referencia que permiten al usuario identificar los resultados de la prueba que se presentan como zonas legibles.

Puesto que los dispositivos de la presente invención pueden incorporar una o más zonas de control, el reactivo de control marcado y sus correspondientes zonas de control se revelan preferentemente de manera que cada zona de control resultará visible con una intensidad deseada para todas las zonas de control tras ponerse en contacto la muestra de fluido con el dispositivo, independientemente de la presencia o ausencia de uno o más analitos de interés.

En una forma de realización, se capturará un único reactivo de control marcado por cada una de las zonas de control en la tira de prueba. Frecuentemente, se depositará un reactivo de control marcado de este tipo sobre o en la zona de marcador en una cantidad que excede la capacidad de la capacidad de unión total de las zonas de control combinadas si estuviesen presentes múltiples zonas de control. Por consiguiente, la cantidad de reactivo de captura específico para el marcador de control puede depositarse en una cantidad que permite la generación de una intensidad de señal deseada en dichas una o más zonas de control, y permite que cada una de las zonas de control contengan una cantidad deseada de reactivo de control marcado. En la finalización de un ensayo, cada una de las zonas de control proporciona preferentemente una señal deseada y/o diseñada previamente (en intensidad y forma). Los ejemplos de señales diseñadas previamente contempladas incluyen señales de intensidades iguales en cada zona de control, o que siguen un patrón deseado de aumento, disminución u otra intensidad de señal en las zonas de control.

En otra forma de realización, cada zona de control será específica para un único reactivo de control. En esta forma de realización, la zona de marcador puede incluir reactivos de control marcados múltiples y diferentes, que igualan el número de zonas de control en el ensayo, o una variación relacionada. En la que cada uno de los reactivos de control marcados puede contenerse en una o más zonas de control predeterminadas y específicas. Estos reactivos de control marcados pueden proporcionar la misma señal detectable (por ejemplo, son del mismo color) o proporcionar señales detectables distinguibles (por ejemplo, presentan marcadores coloreados diferentes u otros sistemas de detección) tras su acumulación en la(s) zona(s) de control.

Aún en otra forma de realización, las zonas de control pueden incluir una combinación de los dos tipos de zonas de

control descritos en las dos formas de realización previas, específicamente, una o más zonas de control pueden contener o unirse a un único tipo de reactivo de control marcado, y otras zonas de control en la misma tira de prueba podrán unirse a uno o varios otros reactivos de control marcados específicamente.

En una forma de realización, el reactivo de control marcado comprende un resto detectable acoplado a un elemento de una pareja de unión específica. Normalmente, se elige un reactivo de control marcado para que sea diferente del reactivo que se reconoce por los medios que pueden contener un analito de interés en la zona de prueba. Además, el reactivo de control marcado generalmente no es específico para el analito. En una forma de realización frecuente, el reactivo de control marcado puede unirse al correspondiente elemento de una pareja de unión específica o compañero de captura de control que se inmoviliza sobre o en la zona de control. Por tanto, el reactivo de control marcado se contiene directamente en la zona de control.

En otra forma de realización, el resto detectable que forma el componente de marcador del reactivo de control marcado es el mismo resto detectable que el que se utiliza como componente de marcador del reactivo de prueba marcado del analito de interés. En una forma de realización frecuente, el componente de marcador del reactivo de control marcado es diferente del componente de marcador del reactivo de prueba marcado, de modo que se determinan fácilmente los resultados del ensayo. En otra forma de realización frecuente, el marcador de control y el marcador de prueba incluyen perlas coloreadas, por ejemplo, látex coloreado. También frecuentemente, las perlas de látex de control y de prueba comprenden colores diferentes.

En una forma de realización adicional, el reactivo de control marcado incluye estreptavidina, avidina o biotina y el compañero de captura de control incluye el correspondiente miembro de tales parejas de unión específica, que se unen fácil y específicamente entre sí. En un ejemplo, el reactivo de control marcado incluye biotina, y el compañero de captura de control incluye estreptavidina. El experto apreciará que pueden utilizarse alternativamente otros miembros de parejas de unión específica, incluyendo, por ejemplo, reacciones de antígeno/anticuerpo no relacionadas con el analito. Aún en otra forma de realización, los compañeros de captura pueden incluir cualquiera de los restos de unión dados a conocer en la presente memoria.

La utilización de una zona de control es útil porque la aparición de una señal en la zona de control indica el momento en el que puede leerse el resultado de la prueba, incluso para un resultado negativo. Por tanto, cuando aparece la señal esperada en la línea de control, puede indicarse la presencia o ausencia de una señal en una zona de prueba.

Todavía en una forma de realización adicional, se utiliza una zona de control que comprende una marca que se vuelve visible en la zona de prueba cuando la zona de prueba está en un estado húmedo. Se describen zonas de control de este tipo en la solicitud de patente US con n.º de serie 09/950.366, presentada el 10 de septiembre de 2001, actualmente en trámite y publicada como publicación de solicitud de patente US n.º 20030049167, y n.º de serie 10/241.822, presentada el 10 de septiembre del 2002, actualmente en trámite y publicada como publicación de solicitud de patente US n.º 20030157699.

En las formas de realización ocasionales, se utilizan una o más zonas de control de este tipo. En otra forma de realización, puede utilizarse una combinación de zonas de control del tipo que utiliza reactivos de control marcados y zona de control y del tipo que presenta la zona de control cuando está en un estado húmedo. Esto permite un modo sencillo de formular zonas de control mientras que se permite utilizar una zona de control a base de reactivos para determinar que la resolubilización y movilización de los reactivos en muestras procesadas mediante el SCD ha sido eficaz, y que tuvieron lugar las reacciones específicas tal como se esperaba, todo a lo largo de la trayectoria definida del dispositivo de prueba, la mecha, la tira de prueba y el lecho absorbente. La presente forma de realización incluye la utilización de una o más zonas de control que devienen visibles cuando la zona de prueba está en el estado húmedo para cada una de las zonas de control de un ensayo, excepto la zona de control en el extremo distal o aguas abajo de la tira de prueba.

La presente descripción proporciona además unos medios para construir un ensayo de múltiples analitos, rápido, que es necesario en muchos campos de monitorización medioambiental, medicina, particularmente en el campo de las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los dispositivos contemplados incluyen aquellos útiles para el diagnóstico diferencial de gripe A o gripe B, y subtipos de las mismas (por ejemplo, gripe A, H5N1), lo que puede dar como resultado diferentes tratamientos, o el diagnóstico diferencial de gripe A, gripe B y/o VRS en una etapa. Tales dispositivos permiten la utilización de una única muestra para someter a ensayo múltiples analitos de una vez, y permiten beneficiosamente una considerable reducción del tiempo de procesamiento y la duración del procedimiento de diagnóstico para el beneficio del doctor, o usuario en general. Como tal puede utilizarse una pluralidad de inmunorreactivos en un SCD de la invención, comprendiendo dicha pluralidad poblaciones de agentes de unión específica, que comprenden parejas conjugadas respectivamente con un marcador y un resto de captura, por lo cual dicha pluralidad comprende múltiples poblaciones, cada una específica para un analito diferente en comparación con cualquier otra población. Por ejemplo, la pluralidad de inmunorreactivos puede ser específica para varios tipos de un patógeno o diferentes patógenos.

Puede someterse a ensayo una variedad de analitos utilizando dispositivos y procedimientos de la presente divulgación. En un dispositivo particular útil para someter a ensayo uno o más analitos de interés en una muestra, la

colección de analitos de interés puede denominarse panel. Por ejemplo, un panel puede comprender cualquier combinación (o todos de) de virus de la gripe A, virus de la gripe B, subtipos de virus de la gripe A, virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus y diferentes tipos de virus parainfluenza (por ejemplo tipos 1, 2, 3 etc.). Otro panel puede comprender pruebas para una selección de uno o más de infección de las vías respiratorias superiores incluyendo, por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Chlamydia pneumoniae*. Aún otro panel puede concebirse para el diagnóstico de una enfermedad transmitida por vía sexual incluyendo, por ejemplo, *Chlamydia*, *Trichomonas* y/o *Gonorrhea*. En cada caso, se obtiene fácilmente un panel particular concebido para proporcionar señales en el dispositivo de prueba para una serie particular de analitos incorporando un conjunto diferente de sondas de detección y captura en el SCD, que se describe en la presente memoria. Por tanto, un SCD particular proporcionará todos los reactivos necesarios para detectar un panel particular de analitos que se detectan cuando se utiliza un dispositivo de prueba que emplea tiras de pruebas que presentan reactivos de detección que no son específicos para los analitos de interés. En otras formas de realización, un dispositivo de prueba de amplio alcance puede comprender restos de captura no específicos para varias series de analitos de patógenos relacionados o distintos, por ejemplo, detección de antígenos de VIH y VHC; VIH y tuberculosis, virus de la gripe A, B y subtipos de A, infecciones bacterianas y virales. Por tanto, puede utilizarse un único dispositivo de prueba con SCD que comprenden inmunorreactivos para un panel de analitos diferente, proporcionando eficacia de coste y eficacia potenciadas.

Por ejemplo, un panel puede incluir opcionalmente una variedad de otros analitos de interés, incluyendo coronavirus asociado a SARS, virus de la gripe A; un panel de hepatitis que comprende una selección de Ac o Ag de superficie de hepatitis B, Ac del núcleo de la hepatitis B, Ac del virus de la hepatitis A y virus de la hepatitis C; un panel de fosfolípidos que comprende una selección de Ac anti-cardiolipina (isotipos de IgG, IgA e IgM); un panel de artritis que comprende una selección de factor reumatoide, anticuerpos antinucleares y ácido úrico; un panel de Epstein Barr que comprende una selección de Ag nuclear de Epstein Barr, Ag de la cápsida viral de Epstein Barr y virus de Epstein Barr, antígeno temprano; otros paneles incluyen paneles de VIH, paneles de lupus, paneles de *H. Pylori*, paneles de toxoplasma, paneles de herpes, paneles de *Borrelia*, paneles de rubeola, paneles de citomegalovirus, paneles para someter a prueba para detectar un infarto de miocardio reciente con analitos que comprenden un isotipo de troponina con mioglobina y/o CKMB y muchos otros. Un experto en la materia entendería que puede someterse a ensayo una variedad de paneles mediante los inmunoensayos que utilizan los dispositivos dados a conocer en la presente memoria. Se conocen en la técnica procedimientos de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, John E. *et al.*, eds. 1999).

Pueden adaptarse numerosos dispositivos analíticos conocidos por los expertos en la materia según la presente invención, para detectar múltiples analitos. A título de ejemplo, pueden modificarse dispositivos de tira reactiva, flujo lateral y flujo continuo, particularmente los que son inmunoensayos, según la presente memoria con el fin de detectar y distinguir múltiples analitos. Los dispositivos de flujo lateral ejemplificativos incluyen los descritos en las patentes US n^{os} 4.818.677, 4.943.522, 5.096.837 (RE 35.306), 5.096.837, 5.118.428, 5.118.630, 5.221.616, 5.223.220, 5.225.328, 5.415.994, 5.434.057, 5.521.102, 5.536.646, 5.541.069, 5.686.315, 5.763.262, 5.766.961, 5.770.460, 5.773.234, 5.786.220, 5.804.452, 5.814.455, 5.939.331, 6.306.642. Otros dispositivos de flujo lateral que pueden modificarse para su utilización en la detección distinguible de múltiples analitos en una muestra de fluido incluyen las patentes US n^{os} 4.703.017, 6.187.598, 6.352.862, 6.485.982, 6.534.320 y 6.767.714. Los dispositivos de tira reactiva ejemplificativos incluyen los descritos en las patentes US n^{os}: 4.235.601, 5.559.041, 5.712.172 y 6.790.611. Los expertos en la materia apreciarán que las patentes mencionadas anteriormente pueden y frecuentemente dan a conocer más de una configuración de ensayo y así mismo se hace referencia en la presente memoria a tales divulgaciones adicionales. Ventajosamente, las mejoras descritas son aplicables a diversas configuraciones de ensayo, especialmente inmunoensayo.

Pueden configurarse SCD o dispositivos de prueba de la invención para utilizarse con sistemas de detección de analitos existentes. Por ejemplo, puede configurarse un SCD de la invención para su utilización con un dispositivo de prueba existente, o puede configurarse/modificarse un dispositivo de prueba existente de acuerdo con las divulgaciones en la presente memoria para un dispositivo de prueba. Algunos dispositivos ejemplificativos que pueden modificarse de tal modo incluyen tira reactiva, flujo lateral, cartucho, multiplexado, placa de microtitulación, microfluido, placa o matrices o plataformas de alta resolución, tales como los dados a conocer en las patentes US n^{os}: 4.235.601, 4.632.901, 5.559.041, 5.712.172 y 6.790.611, 6.448.001, 4.943.522, 6.485.982, 6.656.744, 6.811.971, 5.073.484, 5.716.778, 5.798.273, 6.565.808, 5.078.968, 5.415.994, 6.235.539, 6.267.722, 6.297.060, 7.098.040, 6.375.896, 4.818.677, 4.943.522, 5.096.837 (RE 35.306), 5.096.837, 5.118.428, 5.118.630, 5.221.616, 5.223.220, 5.225.328, 5.415.994, 5.434.057, 5.521.102, 5.536.646, 5.541.069, 5.686.315, 5.763.262, 5.766.961, 5.770.460, 5.773.234, 5.786.220, 5.804.452, 5.814.455, 5.939.331 y 6.306.642. Otros dispositivos de flujo lateral que pueden modificarse para su utilización en la detección distinguible de múltiples analitos en una muestra de fluido incluyen las patentes US n^{os} 4.703.017, 6.187.598, 6.352.862, 6.485.982, 6.534.320 y 6.767.714, 7.083.912, 5.225.322, 6.780.582, 5.763.262, 6.306.642, 7.109.042, 5.952.173 y 5.914.241. Los dispositivos microfluidicos ejemplificativos incluyen los dados a conocer en la patente US n^o 5.707.799, 5.837.115 y el documento W02004/029221. Cada una de las divulgaciones de patentes precedentes se incorpora como referencia a la presente memoria en su totalidad.

Lector.

Los sistemas y procedimientos incluyen un dispositivo de inmunoensayo en combinación con un lector 400, particularmente un lector 400 con un ordenador incorporado, tal como un lector basado en reflectancia y/o fluorescencia, y software de procesamiento de datos que emplea algoritmos de ajuste de curvas y reducción de datos, opcionalmente en combinación con una red neural entrenada para determinar de manera precisa la presencia o concentración de analito en una muestra biológica. Tal como se utiliza en la presente memoria, un lector se refiere a un instrumento para detectar y/o cuantificar datos, tal como sobre tiras de prueba comprendidas en un dispositivo de prueba 401. Los datos pueden ser visibles a simple vista, pero no es necesario que sean visibles. Los procedimientos incluyen las etapas de realizar un inmunoensayo sobre una muestra de un paciente, leer los datos utilizando un lector basado en reflectancia y/o fluorescencia y procesar los datos resultantes utilizando software de procesamiento de datos que emplea reducción de datos. El software preferido incluye algoritmos de ajuste de curvas, opcionalmente en combinación con una red neural entrenada, para determinar la presencia o cantidad de analito en una muestra dada. Los datos obtenidos a partir del lector pueden procesarse adicionalmente mediante el sistema de diagnóstico médico para proporcionar una evaluación del riesgo o un diagnóstico de un estado médico como salida. En formas de realización alternativas, la salida puede utilizarse como entrada en un sistema de soporte de decisiones posterior, tal como una red neural, que está entrenada para evaluar los datos.

En diversas divulgaciones, el lector puede ser un lector de reflectancia, transmisión, fluorescencia, quimioluminiscencia, magnético o de amperometría (o dos o más combinaciones), dependiendo de la señal que va a detectarse a partir del dispositivo de prueba (por ejemplo, LRE Medical, EE.UU.). En una forma de realización, el lector comprende un orificio de recepción diseñado para recibir un dispositivo de prueba, pero en el que el dispositivo de prueba sólo puede insertarse en el orificio de recepción si se ha presionado un medio despreciable (por ejemplo, botón pulsador) de la abertura de entrada de muestras permitiendo que el dispositivo de prueba se ajuste en el orificio de recepción 402. Por tanto, en una forma de realización de este tipo, el dispositivo de prueba se coloca en un lector sólo cuando el contenido del depósito de la disolución (por ejemplo, tampón de lavado) se ha liberado, garantizando que la muestra ha "discurrido a través" de la membrana de flujo lateral comprendida en el dispositivo de prueba.

En una forma de realización, el lector es un lector UV LED que detecta una señal de fluorescencia. La señal de fluorescencia se excita por un diodo emisor de luz que emite en la región UV del espectro óptico y dentro del pico de absorbancia de la señal de fluorescencia (por ejemplo, marcador de lantánido). La señal de fluorescencia emitida se detecta por un fotodiodo y la longitud de onda de la señal detectada puede limitarse utilizando un filtro de paso largo que bloquea la luz emitida dispersa y acepta luz con longitudes de onda en y alrededor de la longitud de onda de emisión pico del marcador que emite fluorescencia. En otras formas de realización, el filtro de paso largo puede reemplazarse por un filtro de paso de banda. Además, la luz de excitación puede limitarse mediante un filtro de paso de banda.

En otras divulgaciones, el diodo es un diodo láser UV. Puede utilizarse cualquier UV, LED o fotodiodo convencional.

En cualquiera de tales divulgaciones, la fuente de excitación y el detector se montan en una única máquina o bloque moldeado. Para una lectura simplificada de las señales fluorescentes generadas sobre la tira de prueba. En una forma de realización adicional, una máquina de este tipo también comprende patrones duros (por ejemplo, figura 33) tal como se describe en la presente memoria.

En una divulgación, el eje de la luz de excitación está a 90 grados con respecto al dispositivo de prueba o tira de prueba comprendida en un dispositivo de prueba. Además, el eje de la luz emitida está a un ángulo distinto de 90 grados con respecto a la tira de prueba.

En una divulgación, la longitud de onda de la luz excitación se limita mediante un filtro de paso corto. Aún en otra forma de realización, la longitud de onda de la luz de excitación se limita mediante una combinación de filtro de paso de banda y filtro de paso corto. Aún en una divulgación adicional, la longitud de onda de la luz detectada se limita por una combinación de filtro de paso largo y de paso de banda. El lector puede estar configurado para detectar cualquiera de los marcadores/emisores de señales descritos en la presente memoria. En una forma de realización, el marcador es cualquiera de los lantánidos descritos en la presente memoria. En una forma de realización adicional, el lantánido utilizado es europio.

Tal como se indica en la presente memoria, en una divulgación, el lector está configurado para comprender uno o más patrones duros. Por tanto, el lector puede mecanizarse para proporcionar un instrumento (por ejemplo, una plantilla) para sostener patrones de 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5 o 3 mm (por ejemplo, encerrados en resina acrílica tal como se describe en la presente memoria), patrón que está dispuesto en centros de aproximadamente 3, 4, 5 o 6 mm (por ejemplo, véanse las figuras 33A, 33B, 34).

En una divulgación, el lector se adapta con un orificio de recepción para el dispositivo de prueba, figura 27, que por sí mismo está configurado con una protección, figura 27C. En una forma de realización, el lector aceptará pero no procesará el dispositivo de prueba 401 si no se ha presionado el botón pulsador, o el lector aceptará y leerá el dispositivo de prueba, pero rechazará el resultado si el control de tampón de lavado no produce una señal positiva,

etc. En esta última forma de realización, un tampón de lavado/ejecución dispuesto en un compartimento/bolsa dispuesto aguas arriba de la muestra, figura 27C, puede contener una señal de control (por ejemplo, un marcador que emite a una longitud de onda diferente) que el lector está programado para detectar.

La señal obtenida por el lector se procesa utilizando software de procesamiento de datos que emplea algoritmos de ajuste de curvas y reducción de datos, opcionalmente en combinación con una red neural entrenada, para dar un resultado o bien positivo o bien negativo para cada línea de prueba, o una determinación cuantitativa de la concentración de cada analito en la muestra, lo que se correlaciona con un resultado indicativo de un riesgo o la presencia de una enfermedad o trastorno. Este resultado puede introducirse opcionalmente en un sistema de soporte de decisiones, y procesarse para proporcionar una evaluación potenciada del riesgo de un estado médico como salida. En una forma de realización, todo el procedimiento puede automatizarse y/o controlarse por ordenador.

Sistema de punto de cuidado de múltiples analitos.

Se han comercializado pruebas rápidas de virus de la gripe durante años. La mayoría de estas pruebas son pruebas de inmunoensayo de flujo lateral que utilizan o bien oro o bien látex como agente de visualización. Aunque la mayoría de los nuevos inmunoensayos rápidos pueden diferenciar virus de la gripe tipo A de virus de la gripe tipo B, sólo unos cuantos de los mismos presentan líneas de prueba para tanto el tipo A como el tipo B en la misma tira. Sin embargo, ninguna de estas pruebas está diseñada para diferenciar subtipos de virus de la gripe tipo A. Aunque estas pruebas pueden detectar gripe aviar, ninguna de ellas puede decir si un paciente está infectado por un virus de gripe A estacional o un subtipo del tipo A más grave tal como H5N1, denominado gripe aviar (o un posible subtipo pandémico actual de gripe A). La presente invención está diseñada sobre conceptos que cuando se aplican producirán un ensayo altamente sensible con reproducibilidad mejorada, que puede detectar el tipo A, el tipo B y diferenciar el subtipo H5N1 de la gripe estacional (subtipos H1 y H3) y es fácil de utilizar. Se han hecho esfuerzos por aplicar múltiples nuevas tecnologías con un nuevo diseño del dispositivo, tales como mezclar previamente la muestra con el conjugado, utilizar un tampón de captación o lavado para reducir el fondo, emplear un reactivo de captura genérico único, pARN, que permite la detección de múltiples analitos a alta sensibilidad, un marcador fluorescente que es altamente sensible, etc. La combinación de estos enfoques permite una prueba rápida de virus de la gripe novedosa y altamente eficaz que es mucho más sensible, proporciona una producción de bajo coste, presenta un funcionamiento fácil y presenta la capacidad para diferenciar gripe estacional de gripe aviar pandémica H5N1.

En una forma de realización, la combinación de características descritas en la presente memoria es responsable de la excelente sensibilidad y reproducibilidad de los ensayos construidos según la invención para utilizar el sistema novedoso, que sirve para concentrar el ligando a partir de una muestra de prueba en un sitio de prueba de la tira de prueba, y la utilización de un sol de metal u otra partícula coloreada como sistema de marcador que permite la observación visual persistente de la fluorescencia a lo largo de un periodo de una a varias horas más allá del tiempo mínimo necesario para completar el ensayo. Se reduce el ruido de fondo mientras que se mantiene una excelente sensibilidad incluyendo en el instrumento de prueba un tampón liberado de manera controlada que funciona eliminando por lavado cualquier marcador en exceso/no unido. Además, uno o más sitios de control cuyo color se compara con el sitio de prueba. En algunas formas de realización, están comprendidos unos medios de filtración en el instrumento de la muestra o en el instrumento de prueba, medios de filtración que limitan la introducción en el sitio de prueba de contaminantes a partir de la muestra biológica bruta o no procesada. Aún en otras formas de realización, los medios de filtración son una membrana e incluyen sondas de detección y captura dispuestas sobre la misma, 604.

Procedimientos de ensayo.

En una divulgación, un procedimiento de ensayo comprende las etapas de aplicar el instrumento de toma de muestras a un sujeto o muestra biológica de un sujeto, recoger una muestra (por ejemplo, frotando con un hisopo el interior de la nariz, la boca, la garganta, el oído; aplicando un elemento de toma de muestras a una muestra biológica obtenida de un sujeto), insertar el instrumento de recogida en la cámara de la carcasa del dispositivo de recogida de muestras, apretar la cámara superior para abrir mediante rotura la válvula de presión y dejar que discurra un tampón hasta el instrumento de toma de muestras, sumergiendo por tanto la muestra biológica dispuesta sobre el mismo y haciendo discurrir la mezcla de tampón y muestra al interior de una cámara de reacción (por ejemplo, cámara inferior) en la que una pluralidad de sondas de captura y detección se unen a su analito diana específico. Posterior o simultáneamente, se expulsa la mezcla del extremo distal del SCD hacia un dispositivo de prueba que comprende restos de captura inmovilizados diseñados para capturar un complejo de analito y sonda de detección/captura, mediante el resto de captura complementario unido a una sonda de captura. Por tanto, una sonda de captura particular está diseñada para que sea complementaria a un resto de captura inmovilizado para un analito particular. Además, tal como se da a conocer en la presente memoria, están dispuestos restos de captura sobre una membrana de flujo lateral en distintas posiciones/patrones, en los que una única línea o mancha(s), si se detecta mediante el marcador que emite señal, permite la detección cualitativa y/o cuantitativa de un analito particular. Por tanto, obteniendo el patrón de sondas de captura particulares en la membrana de flujo lateral, un procedimiento de ensayo puede detectar un panel del mismo agente infeccioso o relacionado o incluso agentes infecciosos no relacionados, tal como se da a conocer en la presente memoria.

En alguna divulgación, se utiliza un formato de inmunoensayo de tipo sándwich, aunque puede utilizarse cualquier formato convencional, incluyendo un ensayo competitivo. Normalmente, se utiliza una captura indirecta del inmunocomplejo formado en el formato de tipo sándwich. Se ponen en contacto uno o más analitos en la muestra con una o más parejas de una sonda de detección y una sonda de captura. Cada pareja contiene la sonda de detección que es un conjugado que comprende un marcador y un agente de unión específica (SBA) que puede unirse específicamente a un analito y una sonda de captura que es un conjugado que comprende un resto de detección y otro SBA que puede unirse específicamente al mismo analito. Los ejemplos de agente(s) de unión específica incluyen anticuerpos, aptámeros. En una forma de realización, cada uno de dos SBA son compañeros de unión específica porque cada uno se une al mismo analito o antígeno diana. Se conocen en la técnica ejemplos de SBA e incluyen pero no se limitan a anticuerpos, aptámeros u oligonucleótidos. En el ensayo de tipo sándwich, al analito se une simultáneamente tanto la sonda de detección como la sonda de captura. El resto de detección es parte de una pareja de unión específica y el otro compañero de la pareja se inmoviliza sobre el dispositivo de prueba para capturar el inmunocomplejo a medida que fluye a través del dispositivo de prueba. La utilización de diferentes parejas de restos de captura para cada analito diferente permite la detección de múltiples analitos sobre un dispositivo de prueba a partir de una única muestra y secuencia de reacción. En la mayoría de los casos, los marcadores para cada analito son diferentes. Sin embargo, al presentar una ubicación específica para cada analito como zona de captura con parejas de restos de captura distintas para cada analito, es posible utilizar el mismo marcador para todos los analitos.

Se describen ejemplos de inmunoensayos de tipo sándwich realizados sobre tiras de prueba en las patentes US n^{os} 4.168.146 y 4.366.241, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia. Los ejemplos de dispositivos de inmunoensayo competitivo son los dados a conocer por las patentes US n^{os} 4.235.601, 4.442.204 y 5.208.535, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia. Algunos dispositivos ejemplificativos adicionales que pueden adaptarse para incorporar uno o más componentes de la presente invención incluyen tira reactiva, flujo lateral, cartucho, multiplexado, placa de microtitulación, microfluídico, placa o matrices o plataformas de alto rendimiento, tales como los dados a conocer en las patentes US n^{os} 6.448.001, 4.943.522, 6.485.982, 6.656.744, 6.811.971, 5.073.484, 5.716.778, 5.798.273, 6.565.808, 5.078.968, 5.415.994, 6.235.539, 6.267.722, 6.297.060, 7.098.040, 6.375.896, 7.083.912, 5.225.322, 6.780.582, 5.763.262, 6.306.642, 7.109.042, 5.952.173 y 5.914.241. Los dispositivos microfluídicos ejemplificativos incluyen los dados a conocer en la patente US n.^o 5.707.799 y el documento WO2004/029221.

En un esquema de este tipo, una tira de prueba contiene una enzima marcada, un compañero de unión móvil para un analito que está en una zona aguas abajo de una zona de aplicación de muestra. Si está presente un analito en la muestra de prueba, se combinará con su compañero de unión marcado formando un complejo que fluirá a lo largo de la tira hasta una zona de detección que contiene un sustrato para el marcador enzimático y que puede proporcionar una respuesta enzimática detectable, por ejemplo, una respuesta de color en presencia de la enzima. La tira también contiene una zona en la que se inmoviliza una cantidad predeterminada de analito, de modo que cualquier compañero de unión marcado que no se combine con el analito, debido a la ausencia del analito en una muestra, se capturará y se inhibirá así de alcanzar la zona de detección.

Alternativamente, la tira puede contener un compañero de unión portador de un resto que presenta una propiedad física detectable. Por ejemplo, el compañero de unión marcado puede incluir uno o más restos, por ejemplo, grupos químicos detectables basándose en determinadas propiedades físicas incluyendo sin limitación especies coloreadas de agentes que fluorescen, moléculas fosforescentes, radioisótopos, restos electroactivos, partículas tales como oro, etc.

En otro esquema, la detección se basa en la competición entre un analito específico, por ejemplo, ligando, antígeno o anticuerpo, cuya cantidad va a determinarse en una muestra, y una cantidad conocida de trazador, que es generalmente el analito o análogo apropiado del mismo en forma marcada, compitiendo el analito y el trazador por un número limitado de sitios de unión disponibles sobre un agente de unión que es específico hacia el analito y el trazador. Por ejemplo, si la concentración de trazador y agente de unión es fija y la única variable es el nivel de analito, entonces puede medirse el nivel desconocido de analito determinando la cantidad de trazador unido y/o libre en el sistema. Los valores determinados en el ensayo se comparan con los valores facilitados por un intervalo de cantidades conocidas del analito tratado de la misma manera, y mediante tal comparación, puede determinarse la cantidad de analito en la muestra.

En general, los trazadores utilizados en tales ensayos requieren o bien instrumentación y/o bien tratamiento del trazador con el fin de determinar el trazador en la parte unida y/o libre del ensayo como una medida del analito. Por ejemplo, en un ensayo en el que se utiliza una enzima como etiqueta o marcador para el trazador, la enzima debe revelarse con un revelador adecuado. Cuando la etiqueta o el marcador es un material fluorescente, el trazador en la parte unida y/o libre se determina mediante la utilización de instrumentación apropiada para determinar la fluorescencia.

Alternativamente, el trazador utilizado en el ensayo es un ligando marcado con un marcador particulado que es visible cuando se une al agente de unión en el soporte o cuando se une al analito unido al agente de unión en el

soporte, sin tratamiento adicional, y en el que al ligando se une o bien el agente de unión o bien el analito. Véase también la patente US nº 4.703.017, que se incorpora a la presente memoria como referencia.

En otro aspecto particular, la prueba de examen no basada en ácido nucleico de la presente invención incluye cualquier prueba de fase sólida, flujo lateral o flujo continuo. En general, los dispositivos de inmunoensayo de fase sólida incorporan un soporte sólido al que se une un miembro de una pareja de ligando-receptor, habitualmente un anticuerpo, antígeno o hapteno. Las formas anteriores comunes de soportes sólidos eran placas, tubos o perlas de poliestireno, que se conocían de los campos de radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático. Más recientemente, se han empleado como soportes sólidos varios materiales porosos tales como nailon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

En una divulgación, se recoge una muestra de un sujeto mediante un instrumento de toma de muestras 102 y se coloca de nuevo en la carcasa cilíndrica del dispositivo SCD 200. El SCD puede insertarse en primer lugar en un dispositivo de prueba, o antes de la inserción en un dispositivo de prueba, se libera una disolución contenida en la cámara sellada superior del SCD para efectuar el lavado de la muestra y la disolución para dar una mezcla aguas abajo en la cámara de reacción. En la cámara de reacción, están dispuestos reactivos o bien líquidos o bien sólidos comprendiendo sondas de detección y captura que seleccionan como diana uno o más analitos diferentes tal como se dan a conocer en la presente memoria, formando de ese modo un complejo de analito unido a sonda de detección y captura. Entonces se expulsa la muestra del SCD al interior de un dispositivo de prueba a través de una abertura que sella el contacto entre el SCD y el dispositivo de prueba del entorno exterior (por ejemplo, evitando cualquier derrame, aerosol o contaminación). La mezcla de muestra puede fluir como resultado de la gravedad o la fuerza de presión de aire producida apretando el SCD (por ejemplo, cámara sellada superior), al interior de un dispositivo de prueba. La muestra se impulsa por la fuerza capilar y/o por el tampón de lavado comprendido en el dispositivo de prueba 307 de modo que se permite que cualquier complejo de analito-sonda pase a través de la membrana de flujo lateral contenida en el dispositivo de prueba. Las sondas de captura y los restos de captura inmovilizados complementarios se unen o se hibridan entre sí en manchas o líneas predeterminadas en la membrana de flujo lateral 803 u 804, mediante lo cual las sondas de detección (mediante marcadores de conjugados contenidos en las mismas) proporcionarán una señal detectable que puede leerse posteriormente para determinar qué analitos estaban presentes en la muestra procesada.

En una forma de realización, pueden guardarse dispositivos de prueba con muestras procesadas sobre los mismos durante periodos de tiempo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 u 8 horas antes de leer los resultados, y proporcionar aún resultados tan precisos como si se leyeran en 15 o 20 minutos tras el procesamiento. Por tanto, las señales producidas son estables durante largos periodos de tiempo de modo que la lectura de los resultados puede producirse en un momento significativamente posterior tras realizarse realmente las pruebas. Esto es una gran mejora para el diagnóstico en puntos de atención, en los que las condiciones de campo presentan a menudo recursos limitados en personal y tiempo, y cuando el entorno de prueba puede ser en zonas remotas a las que no puede accederse fácil o rápidamente.

Reactivos de unión.

Un aspecto de la divulgación se refiere a reactivos de unión dispuestos en el SCD. Por ejemplo, en algunos inmunoensayos, se utiliza una pareja de anticuerpos, en la que cada miembro de la pareja puede unirse específicamente al mismo analito diana, en la que un anticuerpo es un anticuerpo de captura y el otro es un anticuerpo de detección. Un anticuerpo de captura se une, directa o indirectamente, a un resto de captura que se "captura" por un resto de captura inmovilizado relacionado dispuesto sobre un soporte sólido (por ejemplo, membrana de nitrocelulosa). Además, el anticuerpo de detección (es decir, sonda de detección) está unido a un marcador detectable. El anticuerpo de detección está marcado preferentemente mediante conjugación con un marcador físicamente detectable, y tras ponerse en contacto con la muestra que contiene el analito diana, forma un complejo. El complejo de anticuerpo-analito puede inmovilizarse entonces sobre un soporte sólido mediante el resto de captura. El complejo resultante inmovilizado sobre el soporte sólido puede detectarse en virtud del marcador.

En una divulgación, el sustrato sólido o disolución de reactivos del SCD comprende una pluralidad de diferentes sondas de detección, pudiéndose unir cada sonda de detección a una diana diferente y estando marcada cada sonda de detección con o permitiendo la formación de una señal de detección de modo que la presencia de cada diana se indica mediante la formación de una señal en la zona de prueba para esa diana (es decir, en el dispositivo de prueba); en el que la diana para al menos dos de los restos de captura es un agente infeccioso o un microorganismo que provoca una enfermedad o un marcador que indica la existencia de una enfermedad, trastorno, o estado del huésped del que se derivó la disolución de muestra, y en el que al menos dos de los restos de captura pueden unirse a diferentes componentes o marcadores del mismo agente infeccioso o microorganismo que provoca una enfermedad, o a diferentes marcadores para la misma enfermedad, trastorno o afección no provocada por un agente infeccioso o microorganismo que provoca una enfermedad, como dianas para esos restos de captura. Además, el SCD comprenderá también una pluralidad de diferentes sondas de captura, cada una de las cuales se empareja con una sonda de detección, definiéndose el apareamiento por la capacidad para unirse a un analito diana particular.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “se une específicamente” se refiere a la especificidad de unión de una pareja de unión específica. “Miembro de una pareja de unión específica” se refiere a un miembro de una pareja de unión específica (“sbp”), lo que significa dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas se une específicamente con la segunda molécula a través de medios físicos o químicos. Por ejemplo, una pareja de pARN o una pareja de aptámero/antígeno diana, o estreptavidina-biotina proporcionan miembros de parejas de unión específica o sbp a modo de ejemplo. Las dos moléculas están relacionadas en el sentido de que su unión entre sí es tal que pueden distinguir su compañero de unión de otros constituyentes del ensayo que presentan características similares. Los miembros de la pareja de unión específica se denominan ligando y receptor (anti-ligando), miembro de sbp y compañero de sbp, y similares. Una molécula también puede ser un miembro de sbp para una agregación de moléculas; por ejemplo un anticuerpo generado contra un complejo inmunitario de un segundo anticuerpo y su correspondiente antígeno puede considerarse que es un miembro de sbp para el complejo inmunitario.

Además de miembros de parejas de unión específica de antígeno y anticuerpo, otras parejas de unión específica incluyen, como ejemplos no limitativos, biotina y avidina, hidratos de carbono y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, secuencias peptídicas complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, una secuencia peptídica o resto químico (tal como digoxina/anti-digoxina) y un anticuerpo específico para la secuencia, resto químico o la proteína entera, bases y ácidos poliméricos, tintes y agentes de unión de proteína, péptidos y agentes de unión de proteína específicos (por ejemplo, ribonucleasa, péptido S y ribonucleasa proteína S), metales y sus quelantes, y similares. Además, las parejas de unión específica pueden incluir miembros que son análogos del miembro de unión específica original, por ejemplo un análogo de analito o un miembro de unión específica preparado mediante técnicas recombinantes o ingeniería molecular.

Un miembro de sbp es análogo a otro miembro de sbp si ambos pueden unirse a otro miembro de sbp complementario idéntico. Un miembro de sbp de este tipo puede ser, por ejemplo, o bien un ligando o bien un receptor que se ha modificado mediante el reemplazo de al menos un átomo de hidrógeno por un grupo para proporcionar, por ejemplo, un ligando marcado o receptor marcado. Los miembros de sbp pueden ser análogos a o complementarios al analito o a un miembro de sbp que es complementario al analito. Si el miembro de unión específica es un inmunorreactante, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, antígeno, hapteno o complejo de los mismos. Si se utiliza un anticuerpo, puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína o anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, mezcla(s) o fragmento(s) de los mismos, así como una mezcla de un anticuerpo y otros miembros de unión específica. Otros ejemplos de parejas de unión que pueden incorporarse en las moléculas de detección se dan a conocer en las patentes US n^{os} 6.946.546, 6.967.250, 6.984.491, 7.022.492, 7.026.120, 7.022.529, 7.026.135, 7.033.781, 7.052.854, 7.052.916 y 7.056.679.

“Anticuerpo” se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, e incluye cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos, que se unen a un antígeno específico. Un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consiste en una región variable y una primera, segunda y tercera región constante, mientras que cada cadena ligera consiste en una región variable y una región constante. El anticuerpo presenta una forma de “Y”, consistiendo el tallo de la Y en las zonas constantes segunda y tercera de dos cadenas pesadas unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Cada brazo de la Y consiste en la región variable y la primera región constante de una única cadena pesada unidas a las zonas variables y constantes de una única cadena ligera. Las zonas variables de las cadenas ligeras y pesadas son responsables de la unión al antígeno. La región variable en ambas cadenas contiene generalmente tres bucles altamente variables denominados las zonas determinantes de complementariedad (CDR) (incluyendo las CDR de la cadena ligera (L) LCDR1, LCDR2 y LCDR3, incluyendo las CDR de la cadena pesada (H) HCDR1, HCDR2 HCDR3) (tal como se define por Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición (1991), vol. 1-3, publicación de los NIH 91-3242, Bethesda Md.). Las tres CDR están interpuestas entre tramos flanqueantes conocidos como zonas de entramado (FR), que están más altamente conservados que las CDR y forman un armazón para soportar los bucles hipervariables. Las zonas constantes de las cadenas pesadas y ligeras no están implicadas en la unión al antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen las zonas constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como miríadas de genes de zonas variables de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como o bien kappa o bien lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases y subclases de inmunoglobulinas que incluyen IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgA1, o IgA2, IgD e IgE, respectivamente. Normalmente, un anticuerpo es una inmunoglobulina que presenta una zona en su superficie o en una cavidad que se une específicamente a y se define de ese modo como complementaria con una organización espacial y polar particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmentos de la misma. Los fragmentos de la misma pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos quiméricos o fragmentos de los mismos preparados mediante procedimientos recombinantes. El término “anticuerpo” tal como se utiliza en la presente memoria. Los anticuerpos se asignan a clases basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante de su cadena pesada. La clases principales de anticuerpos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dividiéndose varias de estas clases en subclases tales como.

Además de una inmunoglobulina intacta, el término “anticuerpo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere además a un fragmento de inmunoglobulina de la misma (es decir, al menos una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina), tal como un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, una molécula de anticuerpo de

cadena sencilla, un anticuerpo multiespecífico formado a partir de cualquier fragmento de una molécula de inmunoglobulina que comprende una o más CDR. Además, un anticuerpo tal como se utiliza en la presente memoria puede comprender una o más CDR a partir de una inmunoglobulina humana particular injertada con una región de entramado de una o más inmunoglobulinas humanas diferentes.

“Fab” con respecto a un anticuerpo se refiere a la parte del anticuerpo que consiste en una única cadena ligera (regiones tanto variables como constantes) unida a la región variable y la primera región constante de una única cadena pesada mediante un puente disulfuro.

“Fab'” se refiere a un fragmento Fab que incluye una parte de la región de bisagra.

“F(ab')₂” se refiere a un dímero de Fab'.

“Fc” con respecto a un anticuerpo se refiere a la parte del anticuerpo que consiste en las segunda y tercera zonas constantes una primera cadena pesada unidas a las segunda y tercera zonas constantes de una segunda cadena pesada mediante puentes disulfuro. La parte de Fc del anticuerpo es responsable de diversas funciones efectoras pero no funciona en la unión al antígeno.

“Fv” con respecto a un anticuerpo se refiere al fragmento más pequeño del anticuerpo que lleva el sitio de unión a antígeno completo. Un fragmento Fv consiste en la región variable de una única cadena ligera unida a la región variable de una única cadena pesada.

“Anticuerpo Fv de cadena sencilla” o “scFv” se refiere a un anticuerpo modificado por ingeniería genética que consiste en una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada conectadas entre sí directamente o mediante una secuencia de ligador peptídico (Houston 1988).

“Anticuerpo Fv-Fc de cadena sencilla” o “scFv-Fc” se refiere a un anticuerpo modificado por ingeniería genética que consiste en un scFv conectado a la región Fc de un anticuerpo.

El término “epítipo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al grupo de átomos y/o aminoácidos en una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único epítipo en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales contrastan con los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos en los antígenos. Aunque los anticuerpos monoclonales se derivan tradicionalmente de hibridomas, los anticuerpos monoclonales de la presente invención no están limitados por su procedimiento de producción. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente US n.º 4.816.567).

El término “anticuerpo quimérico” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de un anticuerpo de este tipo, siempre que tales fragmentos presenten la actividad de unión a antígeno deseada (patente US n.º 4.816.567 concedida a Cabilly *et al.*; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 6855 (1984)).

El término “anticuerpo humanizado” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o fragmentos del mismo que son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que se reemplazan residuos de parte o toda de una CDR del receptor por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de FR de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de entramado o CDR importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas de las zonas CDR corresponden a una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las zonas FR son las de una

secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una parte de una región Fc de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.*, Nature, 321:522 525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323 329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593 596 (1992); y Clark, Immunol. Today 21: 397 402 (2000).

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-H5 que se producen por cepas de células de hibridoma de ratones 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2. Estos anticuerpos monoclonales se denominan según las cepas de células de hibridoma que los producen. Por tanto, los anticuerpos monoclonales anti-H5 que se producen por las cepas de células de hibridoma de ratones 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2, respectivamente, se denominan anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2 se unen específicamente a la hemaglutinina del virus de la gripe aviar subtipo H5. Las cepas de células de hibridoma de ratones 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2 se depositaron en el China Center for Typical Culture Collection (CCTCC, Wuhan University, Wuhan, China) el 17 de enero del 2006 con los números de depósito de CCTCC - C200607 (cepa de célula de hibridoma 8H5), CCTCC - C200605 (cepa de célula de hibridoma 3C8), CCTCC - C200608 (cepa de célula de hibridoma 10F7), CCTCC - C200606 (cepa de célula de hibridoma 4D1), CCTCC - C200604 (cepa de célula de hibridoma 3G4) y CCTCC - C200424 (cepa de célula de hibridoma 2F2).

En diversas formas de realización, se proporcionan anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 o 2F2 a la hemaglutinina del virus de la gripe aviar subtipo H5. Tales anticuerpos monoclonales bloqueantes pueden unirse a los mismos epítomos en la hemaglutinina que se reconocen por los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 o 2F2. Alternativamente, esos anticuerpos monoclonales bloqueantes pueden unirse a epítomos que se solapan de manera estérica con los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 o 2F2. Estos anticuerpos monoclonales bloqueantes pueden reducir la unión de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 o 2F2 a la hemaglutinina del virus de la gripe aviar subtipo H5 en al menos aproximadamente el 50%. Alternativamente, pueden reducir la unión en al menos aproximadamente el 60%, preferentemente al menos aproximadamente el 70%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, más preferentemente al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 90%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, lo más preferentemente al menos aproximadamente el 99%.

La capacidad de un anticuerpo monoclonal de prueba para reducir la unión de un anticuerpo monoclonal conocido a la hemaglutinina H5 puede medirse mediante un ensayo de competición de rutina tal como se describe en Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Por ejemplo, un ensayo de este tipo puede realizarse recubriendo previamente una placa de microtitulación con antígenos, incubando las placas recubiertas previamente con diluciones en serie de los anticuerpos de prueba no marcados mezclados con una concentración seleccionada de los anticuerpos conocidos marcados, lavando la mezcla de incubación y detectando y midiendo la cantidad de los anticuerpos conocidos unidos a las placas a las diversas diluciones de los anticuerpos de prueba. Cuanto más fuertemente compitan los anticuerpos de prueba con los anticuerpos conocidos por la unión a los antígenos, más se reducirá la unión de los anticuerpos conocidos a los antígenos. Habitualmente, se recubre previamente una placa de 96 pocillos con los antígenos, y se mide la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de los anticuerpos marcados utilizando marcadores radiactivos o enzimáticos.

Pueden generarse anticuerpos monoclonales mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975). En el procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado mediante una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente de inmunización y/o adyuvante se inyectará en el animal huésped mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Puede ser útil conjugar el agente de inmunización con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el animal huésped que está inmunizándose, tal como albúmina sérica, o inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y MPL-IDM. Tras la inmunización, el animal huésped fabrica linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno utilizado para la inmunización. Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Se recogen los linfocitos deseados y se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59 103, Academic Press, 1996).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma no fusionadas, originales. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan una producción de anticuerpo de

alto nivel estable por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOP-21 y MC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Md. EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).

Se somete a ensayo el medio de cultivo en el que se hacen crecer células de hibridoma para detectar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. preferentemente, se determina la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Tras identificarse células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, las células pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer mediante procedimientos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103, Academic Press, 1996). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio DMEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales de la invención mediante procedimientos de ingeniería genética convencionales. Pueden aislarse moléculas de ADN que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales a partir de las células de hibridoma, por ejemplo a través de PCR utilizando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales. Entonces, se insertan las moléculas de ADN en vectores de expresión. Los vectores de expresión se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de lo contrario no producen proteína inmunoglobulina. Las células huésped se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos.

Los anticuerpos de la invención pueden unirse a la hemaglutinina H5 con alta especificidad y afinidad. Los anticuerpos deben presentar baja reactividad cruzada con otros subtipos de hemaglutinina, preferentemente nada de reactividad cruzada con otros subtipos de hemaglutininas. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a hemaglutinina H5 con un valor de K_D inferior a 1×10^{-5} M. preferentemente, el valor de K_D es inferior a 1×10^{-6} M. Más preferentemente, el valor de K_D es inferior a 1×10^{-7} M. Lo más preferentemente, el valor de K_D es inferior a 1×10^{-8} M.

Los anticuerpos de la invención pueden contener la estructura con forma de "Y" convencional compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Además, los anticuerpos también pueden ser el fragmento Fab, el fragmento Fab', el fragmento $F(ab)_2$ o el fragmento Fv, u otro trozo parcial de la estructura con forma de "Y" convencional que mantiene afinidad de unión por la hemaglutinina. La afinidad de unión de los fragmentos por hemaglutinina puede ser superior o inferior a la de anticuerpos con forma de "Y" convencionales.

Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, J. Biochem. Biophys. Methods, 24:107-117, (1992) y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Adicionalmente, estos fragmentos también pueden producirse directamente por células huésped recombinantes (revisado en Hudson, Curr. Opin. Immunol., 11: 548-557 (1999); Little *et al.*, Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)). Por ejemplo, pueden recuperarse fragmentos Fab' directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, Bio/Technology, 10:163 167 (1992)). En otra forma de realización, el $F(ab')_2$ se forma utilizando la cremallera de leucinas GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula de $F(ab')_2$. Según otro enfoque, pueden aislarse fragmentos Fv, Fab o $F(ab')_2$ directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para un experto habitual en la materia.

La presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a hemaglutinina H5. Pueden aislarse moléculas de ácido nucleico que codifican para los anticuerpos a partir de células de hibridoma. Las secuencias de ácido nucleico de las moléculas pueden determinarse utilizando técnicas de rutina conocidas por un experto habitual en la materia. También pueden prepararse moléculas de ácido nucleico de la invención utilizando técnicas de ingeniería genética convencionales así como síntesis química. En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-H5 (HA) o una parte

de la molécula de ácido nucleico. En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-H5 (HA) o una parte de la molécula de ácido nucleico. En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para las CDR de las zonas variables de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo.

En un aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para las zonas variables de la cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las zonas variables de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2 se exponen en SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 5, SEC ID n°: 9, SEC ID n°: 16, SEC ID n°: 20 y SEC ID n°: 24, respectivamente. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las zonas variables de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1 y 2F2 se exponen en SEC ID n°: 3, SEC ID n°: 7, SEC ID n°: 11, SEC ID n°: 18, SEC ID n°: 26, respectivamente. La presente divulgación también incluye análogos degenerativos de las moléculas de ácido nucleico que codifican para las zonas variables de la cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona variantes de ácido nucleico aisladas que comparten identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico de SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 3, SEC ID n°: 5, SEC ID n°: 7, SEC ID n°: 9, SEC ID n°: 11, SEC ID n°: 16, SEC ID n°: 18, SEC ID n°: 20, SEC ID n°: 24 o SEC ID n°: 26. En una realización, las variantes de ácido nucleico comparten al menos el 70% de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 75% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 85% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 90% de identidad de secuencia, lo más preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia, con las secuencias de SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 3, SEC ID n°: 5, SEC ID n°: 7, SEC ID n°: 9, SEC ID n°: 11, SEC ID n°: 16, SEC ID n°: 18, SEC ID n°: 20, SEC ID n°: 24 o SEC ID n°: 26.

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para fragmentos de anticuerpo que todavía pueden unirse específicamente a virus de la gripe aviar subtipo H5.

La presente divulgación proporciona además moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n°: 28-30, SEC ID n°: 34-36, SEC ID n°: 40-42, SEC ID n°: 46-48; SEC ID n°: 52-54 y SEC ID n°: 58-60. La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n°: 31-33, SEC ID n°: 37-39, SEC ID n°: 43-45, SEC ID n°: 49-51, SEC ID n°: 55-57 y SEC ID n°: 61-63.

La presente divulgación proporciona vectores de expresión recombinante que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención. También proporciona células huésped transformadas con las moléculas de ácido nucleico. Además, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de anticuerpos de la invención que comprende cultivar las células huésped en condiciones en las que se expresan las moléculas de ácido nucleico para producir los anticuerpos y aislar los anticuerpos de las células huésped.

SECUENCIAS POLIPEPTÍDICAS DE ANTICUERPOS

Las secuencias de aminoácidos de las zonas variables de la cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2 se han deducido a partir de sus secuencias de ácido nucleico respectivas. Las secuencias de aminoácidos de las zonas variables de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2 se exponen en SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 6, SEC ID n°: 10, SEC ID n°: 17, SEC ID n°: 21 y SEC ID n°: 25, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las zonas variables de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1 y 2F2 se exponen en SEC ID n°: 4, SEC ID n°: 8, SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 19 y SEC ID n°: 27. En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-H5 que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 6, SEC ID n°: 10, SEC ID n°: 17, SEC ID n°: 21 y SEC ID n°: 25. En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos anti-H5 que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 4, SEC ID n°: 8, SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 19 y SEC ID n°: 27.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una cadena pesada de anticuerpo que comprende una región variable que presenta al menos el 70% de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 75% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80% identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 85% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 90% de identidad de secuencia, todavía más preferentemente al menos el 95% identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 6, SEC ID n°: 10, SEC ID n°: 17, SEC ID n°: 21 y SEC ID n°: 25.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una cadena ligera de anticuerpo que comprende una región variable que presenta al menos el 70% de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 75% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 85%

de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 90% identidad de secuencia, todavía más preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 4, SEC ID n°: 8, SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 19 y SEC ID n°: 27.

- 5 Las secuencias de aminoácidos de las CDR de las zonas variables de la cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1, 3G4 y 2F2 también se han determinado tal como sigue:

10 Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 8H5 se exponen en SEC ID n°: 28-30, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 8H5 se exponen en SEC ID n°: 31-33, respectivamente.

15 Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 3C8 se exponen en SEC ID n°: 34-36, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 3C8 se exponen en SEC ID n°: 37-39, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 10F7 se exponen en SEC ID n°: 40-42, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 10F7 se exponen en SEC ID n°: 43-45, respectivamente.

20 Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 4D1 se exponen en SEC ID n°: 46-48, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 4D1 se exponen en SEC ID n°: 49-51, respectivamente.

25 Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 3G4 se exponen en SEC ID n°: 52-54, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 3G4 se exponen en SEC ID n°: 55-57, respectivamente.

30 Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 2F2 se exponen en SEC ID n°: 58-60, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de anticuerpo monoclonal 2F2 se exponen en SEC ID n°: 61-63, respectivamente.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de CDR de seis cepas de anticuerpos monoclonales.

Cepas de anticuerpos monoclonales	Secuencia de aminoácidos de CDR de cadenas pesadas de anticuerpos			Secuencia de aminoácidos de CDR de cadenas ligeras de anticuerpos		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
8H5	GYTFSNYW (SEC ID n°: 28)	ILPGSDRT (SEC ID n°: 29)	ANRYDGYFGLDY (SEC ID n°: 30)	SSVNF (SEC ID n°: 31)	YSS (SEC ID n°: 32)	QHFTSSPYT (SEC ID n°: 33)
3C8	GYSFTNYG (SEC ID n°: 34)	INTHTGEP (SEC ID n°: 35)	ARWNRDAMDY (SEC ID n°: 36)	ESVDSSDNS L (SEC ID n°: 37)	RAS (SEC ID n°: 38)	QQSIGDPPY (SEC ID n°: 39)
10F7	GYTFTSYW (SEC ID n°: 40)	IDPSDSYT (SEC ID n°: 41)	ARGGTGDFHYAMDY (SEC ID n°: 42)	QGISSN (SEC ID n°: 43)	HGT (SEC ID n°: 44)	QYVQFPYT (SEC ID n°: 45)
4D1	GYTFTSYW (SEC ID n°: 46)	IDPSDSFT (SEC ID n°: 47)	ARGGPGDFRYAMDY (SEC ID n°: 48)	QGISSN (SEC ID n°: 49)	(SEC ID n°: 50)	(SEC ID n°: 51)
3G4	GYTFTDYA (SEC ID n°: 52)	INTDYGDT (SEC ID n°: 53)	ARSDYDYFCGMDY (SEC ID n°: 54)	(SEC ID n°: 55)	(SEC ID n°: 56)	(SEC ID n°: 57)
2F2	GFSLTGYG (SEC ID n°: 58)	IWAEGRT (SEC ID n°: 59)	AREVITTEAWYFDV (SEC ID n°: 60)	QSIDY (SEC ID n°: 61)	YAS (SEC ID n°: 62)	QNGHTFPLT (SEC ID n°: 63)

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una cadena pesada de anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma, que comprende las siguientes CDR: (i) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 28-30; (ii) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 34-36; (iii) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 40-42; (iv) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 46-48; (v) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 52-54; o (vi) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 58-60. En una forma de realización, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 28-30, respectivamente. En otra divulgación, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-H5 o a un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos

expuestas en SEC ID n°: 34-36, respectivamente. En otra forma de realización, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 40-42. En otra forma de realización, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 46-48. En otra divulgación, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 52-54. En otra forma de realización, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 58-60.

En otro aspecto, las CDR contenidas en las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal anti-H5 o fragmentos de las mismas de la presente invención pueden incluir una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 28-30, 34-36, 40-42, 46-48, 52-54 y 58-60. preferentemente, la sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos se producen en no más de tres posiciones de aminoácido. Más preferentemente, la sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos se producen en no más de dos posiciones de aminoácido. Todavía más preferentemente, la sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos se producen en no más de una posición de aminoácido.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una cadena ligera de anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma, que comprende las siguientes CDR: (i) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 31-33; (ii) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 37-39; (iii) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 43-45; (iv) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 49-51; (v) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 55-57; o (vi) una o más CDR seleccionadas de SEC ID n°: 61-63. En una realización, la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 31-33, respectivamente. En otra forma de realización de la divulgación, la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 37-39, respectivamente. En otra divulgación, la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 43-45. En otra divulgación, la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 49-51. En otra forma de realización, la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 55-57. En otra divulgación, la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento de la misma comprende tres CDR que presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 61-63.

En otro aspecto, las CDR contenidas las cadenas ligeras del anticuerpo monoclonal anti-H5 o fragmentos de las mismas de la presente invención pueden incluir una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID n°: 31-33, 37-39, 43-45, 49-51, 55-57 y 61-63. preferentemente, la sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos se producen en no más de tres posiciones de aminoácido. Más preferentemente, la sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos se producen en no más de dos posiciones de aminoácido. Todavía más preferentemente, la sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos se producen en no más de una posición de aminoácido.

Tabla 2. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos de 7 aa que se unen al AcM 8H5 o al AcM 3C8

Anticuerpo monoclonal	Secuencias de péptidos 7	N.º de secuencia
8H5	H G M L P V Y	SEC ID n°: 64
	P P S N Y G R	SEC ID n°: 65
	P P S N F G K	SEC ID n°: 66
	G D P W F T S	SEC ID n°: 67
	N S G P W L T	SEC ID n°: 68
3C8	W P P L S K K	SEC ID n°: 70
	N T F R T P I	SEC ID n°: 71
	N T F R D P N	SEC ID n°: 72
	N P I W T K L	SEC ID n°: 73

Las variantes generadas mediante la sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos en las zonas variables de los anticuerpos descritos anteriormente o las CDR descritas anteriormente mantienen la capacidad de unirse específicamente al subtipo H5 de virus de la gripe aviar. La presente divulgación también incluye fragmentos de unión a antígeno de tales variantes.

Pueden prepararse variantes anticuerpo monoclonal de la invención mediante procedimientos de modificación mediante ingeniería genética convencionales. Pueden introducirse mutaciones de ácido nucleico en las moléculas de ADN utilizando procedimientos conocidos por un experto habitual en la materia. Alternativamente, pueden prepararse las moléculas de ácido nucleico que codifican para las variantes de cadena pesada y ligera mediante síntesis química.

En otro aspecto, el procedimiento de examen de la divulgación comprende las etapas de (i) cultivar una biblioteca de presentación de péptidos en condiciones adecuadas para la expresión de péptidos; (ii) poner en contacto la disolución de cultivo con anticuerpos monoclonales de la invención; (iii) seleccionar los clones de fago que se unen específicamente a dichos anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales utilizados para el examen pueden comprender de manera no limitativa los anticuerpos monoclonales 8H5, 3C8, 10F7, 4D1 y 3G4. El ejemplo 12 incluido en la presente memoria describe en detalle un ensayo que examinó satisfactoriamente péptidos cortos que se unen a los anticuerpos monoclonales de la invención utilizando bibliotecas de presentación en fago de péptidos.

Tabla 3. Las secuencias de los péptidos de 12 aa que se unen al AcM 8H5.

N.º de sección de péptido	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de bases
121	MEPVKKYPTRSP (SEC ID n.º: 74)	ATGGAGCCGGTGAAGAAGTATCCGACGCGTTCTCCT (SEC ID n.º: 75)
122	ETQLTTAGLRLL (SEC ID n.º: 76)	GAGACTCAGCTGACTACGGCGGGTCTTCGGCTGCTT (SEC ID n.º: 77)
123	ETPLTETALKWH (SEC ID n.º: 78)	GAGACGCCTCTTACGGAGACGGCTTTGAAGTGGCAT (SEC ID n.º: 79)
124	QTPLTMAALELF (SEC ID n.º: 80)	CAGACGCCGCTGACTATGGCTGCTCTTGAGCTTTTT (SEC ID n.º: 81)
125	DTPLTTAALRLV (SEC ID n.º: 82)	GATACTCCGCTGACGACGGCGGGTCTTCGGCTGGTT (SEC ID n.º: 83)
126	TPLTLWALSGLR (SEC ID n.º: 84)	ACGCCGCTTACGCTTTGGGCTCTTCTGGGCTGAGG (SEC ID n.º: 85)
128	QTPLTETALKWH (SEC ID n.º: 86)	CAGACGCCTCTTACGGAGACGGCTTTGAAGTGGCAT (SEC ID n.º: 87)
129	QTPLTMAALELL (SEC ID n.º: 88)	CAGACGCCTCTGACTATGGCGGGTCTTGAGCTTCTT (SEC ID n.º: 89)
130	HLQDGSPPSSPH (SEC ID n.º: 90)	CAGACGCCTCTGACTATGGCGGGTCTTGAGCTTCTT (SEC ID n.º: 91)
131	GHVTTLSSLRLR (SEC ID n.º: 92)	GGGCATGTGACGACTCTTCTCTTCTGTCTCGCTGCGG (SEC ID n.º: 93)
132	FPNFDWPLSPWT (SEC ID n.º: 94)	TTTCCGAATTTTGATTGGCCTCTGTCTCCGTGGACG (SEC ID n.º: 95)
133	ETPLTEPAFKRH (SEC ID n.º: 96)	GAGACGCCTCTTACGGAGCCGGCTTTTAAGCGGCAT (SEC ID n.º: 97)

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "analito" se refiere al compuesto o la composición que va a detectarse o medirse y que presenta al menos un epítipo o sitio de unión. El analito puede ser cualquier sustancia para la que exista un miembro de unión específica al analito que se produce de manera natural o para la que puede prepararse un miembro de unión específica al analito. Por ejemplo, hidrato de carbono y lectina, hormona y receptor, ácidos nucleicos complementarios, y similares. Además posibles analitos incluyen prácticamente cualquier compuesto, composición, agregación, u otra sustancia que pueda detectarse inmunológicamente. Es decir, el analito, o parte del mismo, será antigénico o hapténico, presentando al menos un sitio determinante, o será un miembro de un par de unión que se produce de manera natural.

Los analitos incluyen, pero no se limitan a, toxinas, compuestos orgánicos, proteínas, péptidos, microorganismos, bacterias, virus, aminoácidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, hormonas, esteroides, vitaminas, fármacos/drogas (incluyendo los administrados para fines terapéuticos así como los administrados para fines ilícitos), contaminantes, pesticidas y metabolitos de o anticuerpos frente a cualquiera de las sustancias anteriores. El término analito también incluye cualquier sustancia antigénica, haptenos, anticuerpos, macromoléculas, y combinaciones de los mismos. Se expone una lista no exhaustiva de analitos a modo de ejemplo en la patente US n.º 4.366.241, en la columna 19, línea 7 a la columna 26, línea 42, cuya divulgación se incorpora a la presente memoria como referencia. Se encuentran descripciones y listados adicionales de analitos representativos en las patentes US n.ºs 4.299.916; 4.275.149; y 4.806.311, todas incorporadas a la presente memoria como referencia. En algunas formas de realización, el dispositivo de prueba o SCD se configuran para detectar una pluralidad de diferentes analitos (por ejemplo, figura 26).

Reactivos marcados

"Reactivo marcado" se refiere a una sustancia que comprende un marcador detectable fijado a un miembro de unión específica (por ejemplo, sonda de detección). La fijación puede ser unión covalente o no covalente, pero el procedimiento de fijación no es crítico para la presente invención. El marcador permite que el reactivo de marcador produzca una señal detectable que está relacionada con la presencia de analito en la muestra de fluido. El

componente de miembro de unión específica del reactivo de marcador se selecciona para unirse directamente al analito o para unirse indirectamente al analito por medio de un miembro de unión específica auxiliar, que se describe en mayor detalle a continuación en la presente memoria. El reactivo de marcador puede incorporarse en el dispositivo de prueba en un sitio aguas arriba de la zona de captura, puede combinarse con la muestra de fluido para formar una disolución de fluido, puede añadirse al dispositivo de prueba por separado de la muestra de prueba, o puede depositarse previamente o inmovilizarse de manera reversible en la zona de captura. Además, el miembro de unión específica puede marcarse antes o durante la realización del ensayo por medio de un procedimiento de fijación adecuado.

“Marcador” se refiere a cualquier sustancia que puede producir una señal que es detectable mediante medios visuales o instrumentales. Diversos marcadores adecuados para su utilización en la presente invención incluyen marcadores que producen señales a través de medios o bien químicos o bien físicos. Tales marcadores pueden incluir enzimas y sustratos, cromógenos, catalizadores, partículas y/o compuestos fluorescentes o de tipo fluorescente, partículas y/o compuestos magnéticos, partículas y/o compuestos quimioluminiscentes, y marcadores radiactivos. Otros marcadores adecuados incluyen marcadores particulados tales como partículas metálicas coloidales tales como oro, partículas no metálicas coloidales tales como selenio o telurio, partículas teñidas o coloreadas tales como un plástico teñido o un microorganismo tintado, liposomas y partículas de látex-polímero orgánico, perlas coloreadas, microcápsulas de polímero, bolsas, eritrocitos, fantasmas de eritrocitos, u otras vesículas que contienen sustancias directamente visibles, y similares. Normalmente, se utiliza un marcador detectable visualmente como componente de marcador del reactivo de marcador, proporcionando de ese modo la lectura visual o instrumental directa de la presencia o cantidad del analito en la muestra de prueba sin la necesidad de componentes productores de señal adicionales en los sitios de detección.

Los marcadores adicionales que pueden utilizarse en la puesta en práctica de la invención incluyen, cromóforos, restos electroquímicos, enzimas, restos radiactivos, grupos fosforescentes, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, o puntos cuánticos, o más particularmente, radiomarcadores, marcadores de fluoróforo, marcadores de punto cuántico, marcadores de cromóforo, marcadores enzimáticos, marcadores de ligando de afinidad, marcadores de espín electromagnético, marcadores de átomo pesado, sondas marcadas con marcadores de dispersión de luz de nanopartículas u otras nanopartículas, isotiocianato de fluoresceína (FITC), TRITC, rodamina, tetrametil-rodamina, R-ficoeritrina, Cy-3, Cy-5, Cy-7, Texas Red, Phar-Red, alofocianina (APC), etiquetas epitópicas tales como el epítipo FLAG o HA, y etiquetas enzimáticas tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, P-galactosidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa y conjugados de hapteno tales como digoxigenina o dinitrofenilo, o miembros de un par de unión que pueden formar complejos tales como estreptavidina/biotina, avidina/biotina o un complejo antígeno/anticuerpo que incluye, por ejemplo, IgG de conejo y anticuerpo anti-IgG de conejo; fluoróforos tales como umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, tetrametil-rodamina, eosina, proteína fluorescente verde, eritrosina, cumarina, metil-cumarina, pireno, verde malaquita, estilbeno, amarillo lucifer, Cascade Blue, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo, ficoeritrina, complejos de lantánidos fluorescentes tales como lo que incluyen europio y terbio, Cy3, Cy5, balizas moleculares y derivados fluorescentes de las mismas, un material luminiscente tal como luminol; materiales de dispersión de luz o de resonancia de plasmón tales como partículas de oro o plata o puntos cuánticos; o material radiactivo que incluye ^{14}C , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , Tc99m, ^{35}S o ^3H ; o carcassas esféricas y sondas marcadas con cualquier otro marcador generador de señal conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, las moléculas detectables incluyen pero no se limitan a fluoróforos así como otras conocidas en la técnica tal como se describe, por ejemplo, en *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Joseph R. Lakowicz (editor), Plenum Pub Corp, 2ª edición (julio de 1999) y la 6ª edición de *the Molecular Probes Handbook* de Richard P. Hoagland.

Pueden emplearse varios sistemas productores de señal para lograr los objetivos de la invención. El sistema productor de señal genera una señal que está relacionada con la presencia de un analito (es decir, molécula diana) en una muestra. El sistema productor de señal también puede incluir todos los reactivos requeridos para producir una señal medible. Otros componentes del sistema productor de señal pueden incluirse en una disolución de revelado y pueden incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos, sustancias de unión específica requeridas para la unión de sustancias generadoras de señal, y similares. Otros componentes del sistema productor de señal pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, y similares. En algunas formas de realización, el sistema productor de señal proporciona una señal detectable mediante medios externos, mediante la utilización de radiación electromagnética, de manera deseable mediante examen visual. Se describen sistemas productores de señal a modo de ejemplo en la patente US n.º 5.508.178.

En alguna divulgación, pueden unirse moléculas de ácido nucleico a la sonda de detección (por ejemplo, oligonucleótidos unidos a anticuerpo), mediante lo cual el ácido nucleico funciona como marcador utilizando marcadores de ácido nucleico. Por ejemplo, una disolución de reactivo o sustrato comprendido en un SCD puede comprender reactivos de detección, pluralidad de agentes de unión específica (SBA) de detección y captura, que comprenden una pluralidad de oligonucleótidos que funcionan para proporcionar una señal detectable, mediante lo cual para una subpoblación dada de SBA (específicos para un analito particular), se tiñen previamente oligonucleótidos conjugados, con una tinción diferente en comparación con otra subpoblación de anticuerpos (específicos para un analito diferente) son tinciones de ácidos nucleicos se que unen a moléculas de ácido nucleico

de manera independiente de la secuencia. Los ejemplos incluyen tintes de intercalación tales como fenantridinas y acridinas (por ejemplo, bromuro de etidio, yoduro de propidio, yoduro de hexidio, dihidroetidio, homodímero de etidio 1 y 2, monoazida de etidio y ACMA); algunos agentes de unión de surco menor tales como indoles e imidazoles (por ejemplo, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Hoechst 34580 y DAPI); y tinciones de ácidos nucleicos variadas tales como naranja de acridina (que también puede dar intercalación), 7-AAD, actinomicina D, LDS751 e hidroxiestilbamidina. Todas las tinciones de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente están disponibles comercialmente de proveedores tales como Molecular Probes, Inc. Todavía otros ejemplos de tinciones de ácidos nucleicos incluyen los siguientes tintes de Molecular Probes: tintes de cianina tales como SYTOX Blue, SYTOX Green, SYTOX Orange, POPO-1, POPO-3, YOYO-1, YOYO-3, TOTO-1, TOTO-3, JOJO-1, LOLO-1, BOBO-1, BOBO-3, POPRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-1, BO-PRO-3, TO-PRO-1, TO-PRO-3, TO-PRO-5, JO-PRO-1, LO-PRO-1, YO-PRO-1, YO-PRO-3, PicoGreen, OliGreen, RiboGreen, SYBR Gold, SYBR Green I, SYBR Green II, SYBR DX, SYTO-40, -41, -42, -43, -44, -45 (azul), SYTO-13, -16, -24, -21, -23, -12, -11, -20, -22, -15, -14, -25 (verde), SYTO-81, -80, -82, -83, -84, -85 (naranja), SYTO-64; -17, -59, -61, -62, -60, -63 (rojo). Otros marcadores detectables incluyen moléculas quimioluminiscentes y cromogénicas, marcadores de densidad electrónica u óptica, etc.

Tal como se indicó anteriormente en determinadas formas de realización, los marcadores comprenden nanocristales semiconductores tales como puntos cuánticos (es decir, puntos Q), descritos en la patente US n° 6.207.392. Los puntos Q están disponibles comercialmente a partir de Quantum Dot Corporation. Los nanocristales semiconductores útiles en la práctica de la invención incluyen nanocristales de semiconductores de los grupos II-VI tales como MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe y HgTe así como composiciones mixtas de los mismos; así como nanocristales de semiconductores de los grupos III-V tales como GaAs, InGaAs, InP e InAs y composiciones mixtas de los mismos. La utilización de semiconductores del grupo IV tales como germanio o silicio, o la utilización de semiconductores orgánicos, también puede ser viable en determinadas condiciones. Los nanocristales semiconductores también pueden incluir aleaciones que comprenden dos o más semiconductores seleccionados del grupo que consiste en los compuestos de los grupos III-V, compuestos de los grupos II-VI, elementos del grupo IV anteriores, y combinaciones de los mismos.

En algunas divulgaciones, se une un aceptor de energía fluorescente como marcador a una sonda de detección (es decir, resto de unión conjugado con una molécula detectora). En una divulgación, el aceptor de energía fluorescente puede formarse como resultado de un compuesto que reacciona con oxígeno singlete para formar un compuesto fluorescente o un compuesto que puede reaccionar con un compuesto auxiliar que se convierte acto seguido en un compuesto fluorescente. Tales compuestos auxiliares pueden estar comprendidos en tampones contenidos en un dispositivo de prueba y/o SCD. En otras divulgaciones, el aceptor de energía fluorescente puede incorporarse como parte de un compuesto que también incluye el agente quimioluminiscente. Por ejemplo, el aceptor de energía fluorescente puede incluir un quelato metálico de un metal de las tierras raras tal como, por ejemplo, europio, samario, teluro y similares. Estos materiales son particularmente atractivos debido a su banda aguda de luminiscencia. Además, los marcadores de lantánidos, tales como europio (III) proporcionan una emisión de señal eficaz y prolongada y son resistentes al fotoblanqueo, permitiendo de ese modo que los dispositivos de prueba que contienen muestra procesada/hecha reaccionar se dejen aparte si es necesario durante un periodo de tiempo prolongado.

Las nanopartículas de quelato de europio (III) fluorescente de larga vida han mostrado poderse aplicar como marcadores en diversos inmunoensayos heterogéneos y homogéneos. Véase, por ejemplo, Huhtinen *et al.* Clin. Chem. oct. de 2004; 50(10): 1935-6. Puede mejorarse el rendimiento del ensayo cuando se utilizan estas nanopartículas marcadas de manera intrínseca en combinación con detección de fluorescencia con resolución temporal. En ensayos heterogéneos, puede ampliarse el intervalo dinámico de ensayos a bajas concentraciones. Además, pueden mejorarse las características cinéticas de los ensayos mediante la utilización de marcadores de nanopartículas de alta actividad específica recubiertas con anticuerpo de detección en vez anticuerpos de detección marcados de manera convencional. En ensayos homogéneos, las nanopartículas de europio (III) han mostrado ser donadores eficaces en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, permitiendo una selección de alto rendimiento sencilla y rápida. Los ensayos basados en marcadores de nanopartículas heterogéneos y homogéneos pueden ejecutarse con diversas matrices de muestras, por ejemplo, suero, heparina, plasma y mucosidad.

En algunas divulgaciones, un marcador (por ejemplo, marcador fluorescente) dado a conocer en la presente memoria, está comprendido como marcador de nanopartículas conjugado con biomoléculas. En otras palabras, puede utilizarse una nanopartícula con una sonda de detección o captura. Por ejemplo, puede utilizarse una nanopartícula marcada con europio (III) unida a anticuerpos monoclonales o estreptavidina (SA) para detectar un analito particular en una muestra, en la práctica de la presente invención (por ejemplo, inmunoensayo basado en nanopartículas). Las nanopartículas sirven como sustrato al que se fijan los agentes de unión específica al analito y al resto de o bien detección (es decir, marcador) o bien de captura.

En diversas divulgaciones de la invención, el marcador utilizado es un metal lantánido. Los lantánidos incluyen pero no se limitan a europio, samario, terbio o disprosio. La fluorescencia de fondo no específica presenta un tiempo de desintegración de sólo aproximadamente 10 ns, de modo que tal fondo se desvanece antes de que se mida la

fluorescencia de la muestra. Además, los quelatos de lantánidos presentan grandes desplazamientos de Stokes. Por ejemplo, el desplazamiento de Stokes para el europio es de casi 300 nm. Esta gran diferencia entre los picos de excitación y emisión significa que la medición de fluorescencia se realiza a una longitud de onda en la que la influencia del fondo es mínima. Además, el pico de emisión es muy agudo, lo que significa que el detector puede ajustarse a límites muy finos y que las señales de emisión de diferentes quelatos de lantánidos pueden distinguirse fácilmente entre sí. Por tanto, en una realización, pueden utilizarse uno o más lantánidos diferentes en el mismo ensayo.

Patrones duros. En una divulgación, un lector de fluorescencia está configurado para comprender un patrón integrado o permanente ("patrón duro"). La expresión "patrón duro" tal como se hace referencia en la presente memoria significa que el dispositivo para leer una muestra de prueba en procedimientos de detección/cuantificación de uno o más analitos comprende un patrón interno, integrado o permanente, frente al que se leen muestras marcadas con el mismo marcador que el utilizado en el patrón duro. En una forma de realización, el patrón duro y el marcador de prueba comprenden un lantánido (por ejemplo, europio III), figura 33.

En una divulgación, el lector es un LED, que comprende una lámpara que emite en la parte de UV A (de 400 a 315 nm) del espectro. La emisión es en la parte visible del espectro. Algunos LED o fotodiodos ejemplificativos o convencionales se dan a conocer en las patentes US n^{os} 7175086, 7135342 y 7106442, incorporándose la divulgación de cada una a la presente memoria en su totalidad.

En otra divulgación, un lector comprende al menos dos patrones duros de diferentes cantidades (por ejemplo, baja y alta concentración de marcador), proporcionando por tanto una comprobación de dos puntos del lector. Por ejemplo, dos (2) patrones duros de lantánido (por ejemplo, europio) se montan de manera permanente sobre los portaobjetos del lector y pueden leerse durante el transcurso de cada lectura de prueba. Como tal, los dos patrones duros pueden utilizarse para determinar el límite de detección inferior (es decir, en un ensayo de cuantificación de analitos o para determinar el menor umbral de detección en ensayos cualitativos). En este caso, se lee la fluorescencia y se representa gráficamente como el porcentaje de fluorescencia (eje y) frente a la concentración (eje x). La línea recta entre los dos lecturas para cada uno de los patrones duros en una representación gráfica de este tipo permite medir la ordenada de ruido (sin marcador) para proporcionar una medición del menor límite de detección.

En algunas divulgaciones, un dispositivo de prueba comprende una cámara (compartimento o bolsa de líquido) que contiene tampón de lavado o ejecución, que funciona para retirar marcador no unido, para reducir o eliminar el ruido de fondo. En diversas formas de realización, dispositivos que comprenden un(os) patrón/patrones duro(s) proporcionan una medición exacta cualitativa así como cuantitativa de analito(s) presente(s) en una muestra y marcado(s) con un marcador que es el mismo que el utilizado en el/los patrón/patrones duro(s).

En algunas divulgaciones, se incrustan patrones duros o se cuelan en un material de polímero, incluyendo vidrio, plástico, vinilo o material acrílico, figura 33B. Tales marcadores incrustados pueden colarse para dar formas/tamaños apropiados. Alternativamente, tales patrones duros pueden cortarse hasta tamaños apropiados para integrarse en un lector. En una forma de realización, se cortan los patrones duros en forma rectangular, cuadrada, oblonga, circular o cualquier forma poligonal. En una forma de realización, se cortan los patrones duros en formas rectangulares, que comprenden dimensiones para la altura de aproximadamente 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,10, 0,11, 0,12, 0,125, 0,126, 0,127, 0,128, 0,129, 0,130, 0,135, 0,140, 0,150 pulgadas; anchura de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,035, 0,039, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0 pulgadas; y longitudes de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,035, 0,039, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0 pulgadas.

En una divulgación, se utiliza un lector que emplea un patrón duro como referencia para normalizar lectores a lo largo de una población, por ejemplo, representando gráficamente el rendimiento del lector posterior frente a un lector "patrón de referencia" predeterminado tal como se ilustra en la siguiente tabla:

Tabla 4

	Patr. de referencia	Prueba
S0	1000	900
S1	5400	5000
S2	10200	11000
S3	19000	20000
S4	22000	23000
S5	50000	50000

Por tanto, cuando el eje y y el x son las mediciones del lector de prueba y el patrón de referencia, respectivamente, el límite de detección inferior es la ordenada de la recta representada gráficamente a través del nivel de ruido (lectura sin marcador).

En una forma de realización, un dispositivo de prueba comprende diferentes pARN cada uno con un molde basado en un analito específico, un SCD complementario comprende una pluralidad de anticuerpos de captura unidos a pARN relacionados con respecto a los inmovilizados en el dispositivo de prueba, y en el que dicha pluralidad comprende diferentes subpoblaciones de anticuerpos específicos para diferentes analitos). Además, la disolución de reactivo de SCD o el sustrato (por ejemplo, sustrato sólido liofilizado) comprenden sondas de detección, o una pluralidad de anticuerpos marcados con europio (III), que consisten en las mismas subpoblaciones de anticuerpos específicos para diferentes analitos. Se conocen en la técnica marcadores de lantánido adicionales que pueden ponerse en práctica en la presente invención, tales como los dados a conocer en la patente US n° 7.101.667. Véase también, por ejemplo, Richardson F.S., "Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminiscent probes and Stains for Biomolecular Systems," Chem. Rev., 82:541-552 (1982).

Por tanto, dependiendo de la elección de marcadores, en algunas formas de realización puede observarse una señal a simple vista, mientras que en otras formas de realización, se utiliza un instrumento de lector en la práctica de la presente invención.

Restos de captura.

En algunas formas de realización, un miembro de un par de restos de captura complementarios se unirá a un agente de unión específico del analito y el otro miembro se inmoviliza en una línea o mancha, figura 8A, respectivamente. Tal como se hace referencia en la presente memoria, la expresión "resto de captura" significa un resto de unión que es específico para una pareja o resto de captura complementario (por ejemplo, pARN específico para pARN complementario, o avidina/estreptavidina-biotina). En una forma de realización, un dispositivo de prueba comprende una combinación de diferentes restos de captura, en el que dichos restos de captura se componen de diferentes sustancias en número y/o tipo. Por ejemplo, una tira de prueba dispuesta en un dispositivo de prueba puede comprender una o más líneas de prueba referenciables que comprenden pARN, anticuerpos y miembros de unión específica (por ejemplo, avidina/biotina). Por tanto, en diversas formas de realización en las que se disponen dos del mismo tipo de restos de captura en una tira de prueba, cada uno será específico para una molécula de pareja complementaria diferente. Por ejemplo, para dos líneas referenciables de pARN, cada línea comprenderá pARN que presenta diferentes secuencias que se unirán específicamente a pARN de secuencias complementarias que se unen ellas mismas a anticuerpos que seleccionan como diana un analito diferente (por ejemplo, virus de la gripe A frente virus de la gripe B). Además, en una configuración de este tipo, las líneas de prueba adicionales pueden comprender diferentes restos de captura (por ejemplo, anticuerpos o avidina) que se unen ellos mismos a sus moléculas de pareja relacionadas. Por tanto en una forma de realización, una tira de prueba comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 líneas de prueba referenciables, que puede comprender cualquier combinación de 1, 2, 3 o 4 tipos diferentes de restos de captura.

Cuando se desea una detección multiplexada (es decir, multianalito), se utiliza una pluralidad de restos de captura, anticuerpos específicos para un(os) analito(s) comprenderán un miembro de un par específico de restos de captura complementarios y anticuerpos que se unen específicamente a un segundo y diferente(s) analito(s) comprenderán un miembro de un segundo y diferente par específico de restos de captura complementarios, etcétera. Por tanto, en una forma de realización, puede detectarse una pluralidad de diferente(s) analito(s), cuando el miembro relacionado de un par de restos de captura se inmoviliza en una ubicación diferenciada en una membrana de prueba comprendida en el instrumento de prueba. Por ejemplo, una pluralidad de anticuerpos en un SCD se compone de anticuerpos que seleccionan como diana diferentes cepas y/o subtipos del virus de la gripe, en la que dichos anticuerpos se componen de pares de anticuerpo de detección-anticuerpo de captura y en la que el anticuerpo de captura presenta un resto de captura específico. Además, cada población de anticuerpos en la pluralidad de anticuerpos está definida por el analito diana particular al que se une el anticuerpo. Por tanto, todos los anticuerpos dirigidos a un analito diana específico presentarán el mismo resto de captura, para los que se disponen restos de captura relacionados/complementarios en el dispositivo de prueba.

En diversas formas de realización, los restos de captura se componen de un oligonucleótido, avidina, estreptavidina, piranosil-ARN (pARN), par de unión antígeno-anticuerpo seleccionado por su alta afinidad, aptámero o una combinación de los mismos. En formas de realización adicionales, un oligonucleótido es ADN o ARN. Además, en algunas formas de realización, se utiliza una combinación de diferentes restos de captura en el mismo sistema de detección de la invención. Por ejemplo, un par de restos de captura para un analito específico comprende un oligonucleótido par, mientras un par de captura para un analito diferente comprende un par de restos de captura que comprende pARN, o avidina o estreptavidina, etc. En otras formas de realización, se utiliza una combinación de tipos diferentes de restos de captura en dispositivos y ensayos de la invención para detectar múltiples analitos (por ejemplo, una pluralidad de anticuerpos de captura mediante lo cual cada población de anticuerpos de captura específicos para un único tipo de analito diana se une a un tipo de restos de captura, y otros anticuerpos específicos del analito se unen a otros, tales como aptámeros, pARN o estreptavidina, etc.)

En una forma de realización, todos los restos de captura son pARN, con múltiples pares de resto de captura de pARN y resto de captura de pareja de pARN (por ejemplo, uno se conjuga con un agente de unión específico y el pARN relacionado se inmoviliza en la membrana de flujo lateral).

pARN

En un aspecto de la invención, se incorporan combinaciones de secuencias de piranosil-ARN (pARN) complementarias en los dispositivos de prueba/SCD de la invención permitiendo la detección específica simultánea de múltiples analitos, figura 32. En diversas formas de realización, una de un par de secuencias de pARN homólogas se inmoviliza en una zona de prueba o estría específica en el dispositivo de prueba, mientras que la otra del par de secuencias de pARN homólogas se conjuga con un resto de unión, que se une específicamente a un analito diana. Por tanto en una forma de realización, se captura un analito diana por el pARN inmovilizado a través de la interacción de la secuencia de pARN inmovilizado con su pARN del par de unión. El analito se detecta mediante una molécula detectora conjugada a un segundo resto de unión 1301 también específico para el mismo analito diana.

En algunas formas de realización, se seleccionan las parejas de unión de pARN de, pero no se limitan a, los siguientes pARN

Tabla 5

Nombre	4'-2'	SEC ID n°:
102a10-3-NH ₂	TAGAACGAAG	98
102b10-3-NH ₂	CTTCGTTCTA	99
119a10-1-NH ₂	TCAGTGGATG	100
119b10-1-NH ₂	CATCCACTGA	101
3a10-1-NH ₂	GTATTGCGAG	102
3b10-1-NH ₂	CTCGCAATAC	103
102a8-2-NH ₂	AACGATTC	104
102b8-2-NH ₂	GAATCGTT	105
119a8-1-NH ₂	AGTGGATG	106
119b8-1-NH ₂	CATCCACT	107
3a8-1-NH ₂	GTATTGCG	108
3b8-1-NH ₂	CGCAATAC	109
4a8	ATGCCTTC	110
4b8	GAAGGCAT	111
5a8	TGATGGAC	112
5b8	GTCCATCA	113
6a8	CAGTAGTG	114
6b8	CACTACTG	115
7a8	TTCCTGAG	116
7b8	CTCAGGAA	117
8a8	GACTCTCT	118
8b8	AGAGAGTC	119

todos los oligos con grupos 4'-C12-amino y 2'-hexanol

Por tanto, cuando existe una pluralidad de sondas de captura (por ejemplo, anticuerpo unidos a pARN), cada sonda de captura se une a un resto de captura, para el que se inmoviliza una sonda de captura relacionada en una ubicación predeterminada en una tira de prueba 310, 903, 904, 905, 906 comprendida en un dispositivo de prueba, figuras 3, 26, 27. Véanse también las figuras 39 a 42, que ilustran la sensibilidad sustancial de la captura de pARN.

Por tanto, una secuencia inmovilizada en una tira de prueba en una línea referenciable específica se unirá específicamente al pARN complementario conjugado con restos de unión anti-analito (por ejemplo, anticuerpo anti-virus). Se demuestra la eficacia de tal especificidad en el ejemplo 6 (por ejemplo, figura 30).

En algunas formas de realización, un dispositivo de prueba que incorpora uno o más pares de unión de pARN, proporciona una sensibilidad de aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 15, 20, 30, 40 o 50 ng/ml.

En algunas formas de realización, se une pARN a una membrana (es decir, tira de prueba) utilizando un ligador de proteína. Por ejemplo, pARN puede conjugarse con una proteína hidrófila. En una forma de realización, la proteína ligadora presenta un peso molecular de al menos desde aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7500, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 110000, 120000, 130000, 140000, 150000, 160000, 170000, 180000, 190000, 200000, 225000, 250000, 300000, 350000 hasta aproximadamente 450000. Un ligador de este tipo puede oscilar en tamaño entre aproximadamente 5 y 10, entre 6 y 11, entre 7 y 12, entre 8 y 13, entre 9 y 14, entre 10 y 15, entre 11 y 16, entre 12 y 17, entre 13 y 18, entre 14 y 19, entre 15 y 20, entre 16 y 21, entre 17

y 22, entre 18 y 23, entre 19 y 24, entre 20 y 25, entre 21 y 26, entre 22 y 27, entre 23 y 28, entre 24 y 29, entre 25 y 30, 35, 40, 45 o 50 AA de largo. El ligador puede ser un péptido o polipéptido. En una forma de realización, el ligador es BSA o IgG.

En una forma de realización, se acopla pARN a una proteína hidrófila/péptido mediante un enlace covalente entre la molécula de pARN y la proteína hidrófila. Se aplica una disolución que contiene el complejo pARN-proteína a zonas definidas en una membrana de prueba (por ejemplo, nitrocelulosa), mediante lo cual el anclaje de proteína se une a la membrana de manera irreversible. El pARN está disponible entonces para su utilización en el ensayo. En una forma de realización, la proteína de anclaje/ligadora es una proteína hidrófila y la membrana de prueba es nitrocelulosa.

Tal como se indicó previamente, un dispositivo de prueba puede comprender líneas de prueba referenciables que utilizan tipos diferentes de un resto de captura (por ejemplo, una combinación de anticuerpos, ácidos nucleicos, pARN, avidina/estreptavidina/biotina). En una forma de realización (por ejemplo, figura 32), al menos una línea referenciable o zona de captura específica 1305, 1312 comprende una secuencia de pARN 1304, 1311 que está unida a un soporte sólido 1308 (por ejemplo, nitrocelulosa, poliestireno, vidrio, plástico, metal, etc.) y es específico en la unión para una secuencia de pARN homóloga conjugada con un segundo resto de unión 1302, 1310 que es específico para un analito 1306 diana particular. Además, una primera molécula de agente de unión es una pareja para la primera molécula de agente de unión y dicha segunda molécula de agente de unión se conjuga con una molécula detectora 1301, 1309 (por ejemplo, marcador fluorescente). Tal como se demuestra en el ejemplo 6 en la presente memoria, pARN se inmoviliza eficazmente y puede unirse específicamente a una secuencia complementaria para permitir la detección de un analito. Como tal, el pARN proporciona una nueva herramienta para detectar múltiples analitos basándose en la gran especificidad y avidez de las moléculas de pARN.

En una forma de realización, se disponen moléculas de pARN en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 líneas referenciables distintas (es decir, zonas de captura) en un dispositivo de prueba. En otras formas de realización, se utilizan pARN en combinación con anticuerpos, pares de unión de ácido nucleico y avidina/estreptavidina, digoxina/anti-digoxina. Por ejemplo, un dispositivo de prueba comprende una tira de prueba con 5 zonas de captura/prueba referenciables, en la que cada zona de prueba es específica para un analito (por ejemplo, virus de la gripe tipo A o B) y/o subtipo distinto (por ejemplo, subtipos no pandémico y pandémico de virus de la gripe A). Por tanto, por ejemplo, dos zonas de prueba utilizaron unión a pARN, mientras que otra utiliza estreptavidina/avidina-biotina, mientras que la otra utiliza anticuerpo fijado, y aún otra utiliza ADN/ARN. En este ejemplo, para cada tipo de sistema de unión, existe una pareja de unión complementaria que es específica para el analito diana que se "captura" en la zona de prueba particular. Además, tal como se describe en la presente memoria, el analito también está unido mediante un agente de unión que se conjuga con una molécula detectora/marcador (por ejemplo, marcador de fluorescencia). Como tal, una vez que el complejo analito-detector-pareja de unión fluye a través del dispositivo de prueba, el complejo se captura en la zona de prueba distinta que presenta la pareja de unión inmovilizada.

Como tal, un aspecto fundamental de los presentes dispositivos de prueba/SCD de la invención es que pueden configurarse para detectar múltiples analitos, incluyendo células, componentes celulares (por ejemplo, marcadores celulares, marcadores de la superficie celular), proteínas (por ejemplo, enzimas) y similares.

En una forma de realización, los dispositivos de prueba/SCD de la invención pueden utilizarse en un procedimiento para someter a ensayo cualquier estado patógeno para la que se conocen o se identifiquen en el futuro analitos correspondientes particulares. El dispositivo de prueba y SCD pueden configurarse para proporcionar cualquier combinación de los reactivos de detección dados a conocer en la presente memoria (por ejemplo, pARN, ácidos nucleicos, anticuerpos, parejas de unión específicas, por ejemplo, avidina/biotina). Por ejemplo, pueden identificarse múltiples analitos correspondientes a infarto de miocardio (IM) en la detección/el diagnóstico de IM. Se conocen en la técnica marcadores para diversos estados, tales como para los marcadores cardíacos dados a conocer en las patentes US n^{os}: 5.604.105; 5.710.008; 5.747.274, 5.744.358 y 5.290.678, incorporándose las divulgaciones de cada una a la presente memoria en su totalidad.

En una forma de realización, se diseñarían los dispositivos de la invención para proporcionar un ensayo tres en uno para marcadores cardíacos basados en proteína de infarto de miocardio (véase el ejemplo 10).

En una forma de realización, se aplica una muestra de manera que permite el mezclado con una mezcla (en serie o en paralelo) de un primer agente de unión conjugado con un reactivo detector (por ejemplo, combinaciones de micropartículas de oro y marcador fluorescente) y con un segundo agente de unión conjugado con un primer miembro de un par de unión homólogo de pARN que puede contener o no materiales para permitir una reacción de unión inmunitaria y/o unión específica de los pares de unión homólogos de pARN.

Si se desea, se diseña una preincubación en el sistema mediante el cual se permite que los agentes de unión primero y segundo se unan a y formen un puente con el analito formador de complejo, y una etapa de este tipo puede ser durante el flujo de reactivos hasta la zona de prueba o captura. Alternativamente, el flujo puede detenerse para permitir que la reacción se aproxime más a completarse. Aún en otra forma de realización, la mezcla de reactivos en un SCD de la invención antes de aplicarse a un dispositivo de prueba.

Una mezcla fluye mediante la acción capilar o presión hidrostática de cualquiera de varios mecanismos u otra acción no capilar a lo largo de la superficie de o dentro de una matriz de un material/sustrato sólido (por ejemplo, tira de prueba) permitiendo que los pares de unión homólogos primero y segundo entren en contacto a medida que la mezcla de reacción pasa por/a través de zona de prueba/captura. Si los primer y segundo agentes de unión han formado un puente con el analito, figura 32, el reactivo detector (por ejemplo, europio) se acumulará en la zona de prueba/captura produciendo una señal que puede interpretarse visualmente o utilizando un lector de instrumento.

En las formas de realización en las que se trata de detectar múltiples analitos diferentes, se utilizan diferentes reactivos detectores para cada analito y cada analito diferente se captura en una única zona de detección/captura. Se utiliza un lector de instrumento para distinguir entre la señal para cada analito. En una forma de realización, el lector de instrumento puede detectar un único para proporcionar una medición cualitativa y cuantitativa.

En otra forma de realización, se utilizan pares de unión homólogos de pARN únicos para cada analito diana.

En otra forma de realización, se libera un tampón de lavado o tampón de reactivo a través de la trayectoria de flujo (tal como se describe en la presente memoria) pudiendo comprender dicho tampón un reactivo que produce la liberación de energía de cualquiera de varias formas que puede detectarse con un instrumento, lector o visualmente. Por ejemplo, la reacción puede dar como resultado la liberación de luz, electrones o puede requerir la introducción de electrones más un sustrato que produce la liberación de luz. Tales reacciones las conoce un experto en la materia.

Tales reacciones pueden dar como resultado la habilitación para que fluoreszca un compuesto fluorescente tras entrar en contacto con el tampón de ejecución/lavado, dando como resultado la liberación de electrones, protones, neutrones, que pueden detectarse mediante un instrumento o lector tal como se describe en la presente memoria.

Aptámeros.

En algunas formas de realización, los restos de captura son moléculas de aptámero que pueden utilizarse de manera intercambiable con una sonda de captura o como un resto de captura inmovilizado incluido en la membrana de flujo axial del dispositivo de prueba. Los aptámeros incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos. En una forma de realización preferida, los aptámeros incluyen secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas a los ligandos de ácido nucleico aislados mediante el procedimiento SELEX. Sustancialmente homólogas quiere decir un grado de homología de secuencia primaria superior al 70%, lo más preferentemente superior al 80%. La metodología "SELEX", tal como se utiliza en la presente memoria, implica la combinación de ligandos de ácido nucleico seleccionados, que interaccionan con un analito diana en una acción deseada, por ejemplo la unión a una proteína, con la amplificación de esos ácidos nucleicos seleccionados. El ciclado iterativo opcional de las etapas de selección/amplificación permite la selección de uno o un pequeño número de ácidos nucleicos, que interaccionan de la manera más fuerte con el antígeno/biomarcador diana de una combinación, que contiene un número muy grande de ácidos nucleicos. El ciclado del procedimiento de selección/amplificación se continúa hasta que se logra un objetivo seleccionado. La metodología SELEX se describe en las siguientes patentes y solicitudes de patente US: solicitud de patente US con n.º de serie 07/536.428 y patentes US n.ºs 5.475.096 y 5.270.163.

Agentes infecciosos.

En diversas formas de realización de las presentes composiciones y procedimientos, un agente infeccioso puede ser cualquier patógeno incluyendo sin ninguna limitación bacterias, levaduras, hongos, virus, parásitos eucariotas, etc. En algunas formas de realización, el agente infeccioso es virus de la gripe, virus parainfluenza, adenovirus, rinovirus, coronavirus, virus de la hepatitis A, B, C, D, E, etc., VIH, enterovirus, virus del papiloma, virus de Coxsackie, virus del herpes simple o virus de Epstein-Barr. En otras formas de realización, el agente infeccioso es *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Clostridium* o *E. coli*. Resultará evidente para un experto en la materia que las composiciones y los procedimientos de la invención pueden adaptarse fácilmente a diferentes agentes infecciosos, utilizando un panel diferente de agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) que son específicos para tipo(s) o subtipo(s) de un(os) agente(s) infeccioso(s).

Habitualmente, el tipo general de un agente infeccioso puede ser tipo de género de un agente infeccioso o cualquier tipificación o identificación primaria o en primera instancia de un agente infeccioso. Un subtipo de un agente infeccioso puede ser la especie o el tipo de cepa de un agente infeccioso o cualquier tipificación secundaria o posterior de un agente infeccioso. Según la presente invención, la identificación del tipo general o subtipo de un agente infeccioso puede llevarse a cabo mediante diversas configuraciones de prueba adecuadas. Por ejemplo, la identificación del tipo general de un agente infeccioso puede incluir una o más pruebas de examen para determinar 1) un tipo general específico de un agente infeccioso, 2) determinados tipos generales deseados o seleccionados de un agente infeccioso, o 3) todos o sustancialmente todos los tipos generales relevantes de un agente infeccioso, o una combinación de los mismos. De manera similar, la identificación del subtipo de un agente infeccioso puede incluir una o más pruebas de examen para determinar 1) uno o más subtipos específicos de un agente infeccioso, 2)

uno o más subtipos específicos de un tipo general particular de un agente infeccioso, 3) uno o más subtipos específicos de un agente infeccioso seleccionado basándose en información adicional asociada con el sujeto que esté sometiendo a prueba, por ejemplo, uno o más subtipos sospechados o esperados para una población o ubicación geográfica particular o 4) uno o más subtipos potencialmente pandémicos o epidémicos de un agente infeccioso que es idéntico a o se asocia con el agente infeccioso sometido a prueba para determinar el tipo general, o una combinación de los mismos.

Según otro aspecto de la presente invención, el procedimiento proporcionado por la presente invención puede incluir opcional o adicionalmente la identificación del tipo general y/o subtipo(s) de un segundo agente infeccioso que está estrechamente relacionado con el primer agente infeccioso, o alternativamente la infección del segundo agente infeccioso se asocia o probablemente se acopla con la infección del primer agente infeccioso. En una realización, el procedimiento proporcionado por la presente invención incluye la identificación del/de los tipo(s) general(es) y subtipo(s) de un virus así como una bacteria. Por ejemplo, la infección por VIH puede asociarse con una determinada infección bacteriana, por tanto será útil para identificar el/los tipo(s) general(es) y subtipo(s) de VIH así como *Mycobacterium* y/o *Pneumocystis carina*. Específicamente, el procedimiento proporcionado por la presente invención incluye la identificación de VIH y una o más especies de *Mycobacterium* y/o *Pneumocystis carina*.

En otra forma de realización, el procedimiento proporcionado por la presente invención incluye la identificación del/de los tipo(s) general(es) y subtipo(s) de un primer virus así como un segundo virus. Por ejemplo, el procedimiento proporcionado por la presente invención puede incluir la identificación del/de los tipo(s) general(es) y subtipo(s) de VIH así como virus de la hepatitis o alternativamente el/los tipo(s) general(es) y subtipo(s) de VIH así como el tipo general del virus de la hepatitis o determinadas cepas del virus de la hepatitis. En una forma de realización, los procedimientos y las composiciones de la invención pueden utilizarse en ensayos para detectar *E. coli* 0157 (una cepa infecciosa muy peligrosa, a menudo mortal) en presencia de otras cepas entéricas o infecciosas. Otro ejemplo sería en pruebas de pacientes para determinar infección por el virus de la gripe, cuando se sabe que se produce mutación o variación de las cepas dentro de los subtipos y algunas formas del virus de la gripe son bastante más patógenas que otras. Un ejemplo adicional es la detección de diferentes tipos de VIH, por ejemplo VIH-1 y VIH-2. En un aspecto, la identificación del tipo general del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede incluir el examen para determinar la presencia de VIH mientras que la identificación del subtipo de VIH puede incluir el examen para determinar VIH-1, VIH-2, y/u otros subtipos de VIH. De manera similar, la identificación del tipo general del virus del herpes tal como el virus del herpes simple (VHS) puede incluir el examen para determinar la presencia de VHS mientras que la identificación del subtipo de VHS puede incluir el examen para determinar VHS tipo 1 y/o VHS tipo 2 o para determinar el virus de Epstein-Barr y subtipos de VEB.

Todavía en otro aspecto particular, la identificación del tipo general de enterovirus puede incluir el examen para determinar la presencia de uno o más enterovirus, por ejemplo, poliovirus, virus de Coxsackie, ecovirus, enterovirus designado, etc. mientras que la identificación del subtipo de enterovirus pueden incluir el examen para determinar poliovirus, por ejemplo, serotipo 1-3, virus de Coxsackie A, por ejemplo, serotipo 1-22 y 24, virus de Coxsackie B, por ejemplo, serotipo 1-6, ecovirus, por ejemplo, serotipo 1-9, 11-27, 29-31, y enterovirus designado, por ejemplo, enterovirus 68-71, etc.

En general, con respecto a la identificación de un agente infeccioso bacteriano del tipo general y subtipo de un agente infeccioso bacteriano incluye el examen para determinar el género y una o más especies o cepas del agente infeccioso bacteriano que son relevantes para la infección y/o la resistencia antimicrobiana del agente. En una realización, la identificación del tipo general y subtipo de un agente infeccioso bacteriano incluye el examen para determinar *Mycobacterium* y una o más especies de *Mycobacterium* incluyendo sin limitación *tuberculosis*, *avium*, *bovis*, *chelonae*, *fortuitum*, *intracellulare*, *kansasii*, *leprae*, etc. En otra forma de realización, la identificación del tipo general y subtipo de un agente infeccioso bacteriano incluye el examen para determinar *Salmonella* y una o más especies de *Salmonella* incluyendo sin limitación *typhi*, *enteritidis*, etc. Aún en otra forma de realización, la identificación del tipo general y subtipo de un agente infeccioso bacteriano incluye el examen para determinar *Shigella* y una o más especies de *Shigella* incluyendo sin limitación *dysenteriae*. Aún en otra forma de realización, la identificación del tipo general y subtipo de un agente infeccioso bacteriano incluye el examen para determinar *Streptococcus* y una o más especies de *Streptococcus* incluyendo sin limitación *pneumonia*, *pyogenes* (grupo A), etc. Todavía aún en otra forma de realización, la identificación del tipo general y subtipo de un agente infeccioso bacteriano incluye el examen para determinar *E. coli* y una o más cepas de *E. coli* incluyendo sin limitación cepas enterotoxigénicas.

Según la presente invención, la(s) prueba(s) de examen utilizada(s) para la identificación del/de los tipo(s) general(es) y subtipo(s) de un agente infeccioso puede(n) ser cualquier prueba adecuada conocida o descubierta posteriormente en el campo. Por ejemplo, las pruebas de examen de la presente invención pueden ser una prueba no basada en ácido nucleico incluyendo sin ninguna limitación una prueba basada en proteína, péptido, aminoácido, ligando o química. En una forma de realización, la prueba de examen de la presente invención es una prueba basada en la presencia o ausencia de una o más proteínas estructurales de un agente infeccioso, por ejemplo, glicoproteínas, proteínas de la envuelta, polisacáridos, etc. En otra forma de realización, la prueba de examen de la presente invención es una prueba basada en la presencia o ausencia de uno o más antígenos o epítopos, o anticuerpos frente a un agente infeccioso. Aún en otra forma de realización, la prueba de examen de la presente

invención es una prueba basada en la presencia o ausencia de una o más sustancias que se liberan o metabolizan por un agente infeccioso. Todavía aún en otra forma de realización, la prueba de examen de la presente invención es una prueba basada en la presencia o ausencia de una o más sustancias derivadas de una célula huésped asociada con o generada por la infección de un agente infeccioso.

En un aspecto particular, la prueba de examen no basada en ácido nucleico de la presente invención incluye los inmunoensayos o ensayos de unión a ligandos utilizados comúnmente, por ejemplo, ensayos de ligandos o inmunocromatográficos. Muchos de estos ensayos se basan en las interacciones altamente específicas entre pares de unión específicos. Los ejemplos de tales pares de unión incluyen antígeno/anticuerpo, hapteno/anticuerpo, lectina/hidrato de carbono, apoproteína/cofactor y biotina/(estrept)avidina. Además, muchos de estos ensayos implican dispositivos (por ejemplo, de fase sólida, tiras de prueba de flujo lateral, pruebas directas) con uno o más de los miembros de un par de unión unido a un material de fase sólida móvil o inmóvil tal como perlas de látex, fibras de vidrio, perlas de vidrio, tiras de celulosa o membranas de nitrocelulosa (patente US n.^{os} 4.703.017; 4.743.560; 5.073.484).

En una forma de realización, los procedimientos y el aparato de la invención se utilizan para detectar o identificar un subtipo de virus de la gripe tipo A y/o virus de la gripe tipo B y/o virus de la gripe tipo C.

El virus de la gripe pertenece al género de los ortomixovirus en la familia de *Orthomyxoviridae*. Un virus con envuelta de ARNmc con simetría helicoidal. Unas partículas con envuelta de 80-120 nm de diámetro. El ARN se asocia estrechamente con la nucleoproteína (NP) para formar una estructura helicoidal. Se segmenta el genoma, con 8 fragmentos de ARN (7 para virus de la gripe C). Existen 4 antígenos principales presentes, las proteínas hemaglutinina (H), neuraminidasa (N), nucleoproteína (NP) y de la matriz (M). La NP es un antígeno específico de tipo que aparece en 3 formas, A, B y C, que proporcionan la base para la clasificación de virus de la gripe humanos y no humanos. La proteína de la matriz (proteína M) rodea la nucleocápside y constituye el 35-45% de la masa de la partícula. Además, se observan 2 glicoproteínas de superficie en la superficie como salientes en forma de varilla. La hemaglutinina (H) está compuesta por 2 subunidades, H₁ y H₂. La hemaglutinina media la fijación del virus al receptor celular. Están presentes moléculas de neuraminidasa en menores cantidades en la envuelta. Las diferencias antigénicas de los antígenos de la hemaglutinina y la neuraminidasa de los virus de la gripe A proporcionan la base de su clasificación en subtipos. Por ejemplo, A/Hong Kong/1/68 (H3N2) significa un virus de la gripe A aislado de un paciente en 1968, y de subtipo H3N2.

En diversas formas de realización, los procedimientos y el aparato de la invención se dirigen a la detección o identificación de virus de la gripe tipo A que se define mediante HxNy donde x es 1-16 e y es 1-9, o cualquier combinación de xy del mismo. Por ejemplo, en una forma de realización, los procedimientos y el aparato de la invención se utilizan para detectar virus de la gripe A subtipo H1N5. Por tanto, se dispone una pluralidad de sondas de detección y sondas de captura que seleccionan como diana diferente subtipos de virus de la gripe en un SCD de la invención. En una forma de realización, el ensayo se utiliza para detectar virus de la gripe A (con subtipos H1/H3, y un subtipo pandémico H5) y virus de la gripe B.

En particular, el tipo general de un virus de la gripe puede ser cualquier tipo designado basándose en características antigénicas de los antígenos de la nucleoproteína y la proteína de matriz, por ejemplo, virus de la gripe tipo A, B, o C, mientras que el subtipo puede ser uno o más tipos subdivididos de un virus de la gripe basándose en un antígeno, por ejemplo uno o más subtipos de virus de la gripe tipo A o tipo B caracterizado por un antígeno de superficie tal como hemaglutinina (H) o neuraminidasa (N).

En una forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la gripe incluye el examen para determinar virus de la gripe tipo A, tipo B, y/o tipo C mientras que la identificación del subtipo de virus de la gripe, por ejemplo, virus tipo A incluye el examen para determinar uno o más subtipos esperados de tipo A, por ejemplo, subtipos que se espera que estén presentes en la población en el momento de las pruebas, y opcionalmente uno o más subtipos esperados, por ejemplo, subtipos bajo vigilancia para determinar un brote tal como brote epidémico o pandémico. En otra forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la gripe incluye el examen para determinar virus de la gripe tipo A y tipo B mientras que la identificación del subtipo de virus de la gripe, por ejemplo, virus tipo A incluye el examen para determinar uno o más subtipos utilizados para la producción de la vacuna contra el virus de la gripe, por ejemplo, subtipos(s) o cepa(s) de vacuna actuales para la temporada de pruebas incluyendo subtipos y/o cepas que se espera que estén en circulación durante la siguiente temporada de virus influenza. Aún en otra forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la gripe incluye el examen para determinar virus de la gripe tipo A y tipo B mientras que la identificación del subtipo de virus de la gripe, por ejemplo, tipo A incluye el examen para determinar uno o más subtipo(s) o cepa(s) utilizado(s) para la producción de la vacuna contra el virus de la gripe y uno o más subtipo(s) o cepa(s) sospechoso(s) de ser la causa de un brote pandémico, por ejemplo, uno o más subtipo(s) o cepa(s) aviar(es) tal(es) como H5N1 o los derivados de los mismos.

Aún en otra forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la gripe incluye el examen para determinar virus de la gripe tipo A y tipo B mientras que la identificación del subtipo de un virus de la gripe, por ejemplo, tipo A incluye el examen para determinar uno o más subtipos comunes o esperados en circulación incluyendo, sin ninguna limitación, a) H₁ y H₃, b) H₁, H₃ y H₂, c) H₁, H₂, H₃ y H₉, d) H₁, H₃ y N₁, e) H₁, H₃, N₁ y N₂, f)

H₁, H₃ y N₂, g) N₂ y h) N₁ y N₂. Por ejemplo, una prueba de examen para la identificación del subtipo de virus de la gripe tipo A puede dirigirse a la identificación de la presencia de uno cualquiera de los subtipos enumerados en el grupo de subtipos de a), b), c), d), e), f), g) o h) por ejemplo, sin identificar necesariamente la presencia de un subtipo específico en un grupo de subtipos. Alternativamente, la prueba de examen para la identificación del subtipo de virus de la gripe tipo A puede dirigirse a la identificación de la presencia o ausencia de todos y cada uno de los subtipos enumerados en a), b), c), d), e), f), g) o h) por ejemplo, identificar la presencia de un subtipo específico en un grupo de subtipos.

Todavía en otra forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la gripe incluye el examen para determinar virus de la gripe tipo A y tipo B mientras que la identificación del subtipo de un virus de la gripe, por ejemplo, tipo A incluye el examen para determinar uno o más subtipos pandémicos o no esperados en circulación incluyendo, sin ninguna limitación, a) H₅, b) H₅ y H₇, c) H₅, H₇ y H₉, d) N₂, N₇ y N₈, e) H₅ y N₂, f) H₅ y N₁, g) H₅ y N₈, h) H₅, N₈, H₇ y N₇, i) H₅, H₇, H₉, N₇ y N₈. Por ejemplo, una prueba de examen para determinar la identificación del subtipo de virus de la gripe tipo A puede dirigirse a la identificación de la presencia de uno cualquiera de los subtipos enumerados en el grupo de subtipos de a), b), c), d), e), f), g), h) o i) por ejemplo, sin identificar necesariamente la presencia de un subtipo específico en un grupo de subtipos. Alternativamente la prueba de examen para la identificación del subtipo de virus de la gripe tipo A puede dirigirse a la identificación de la presencia o ausencia de todos y cada uno de los subtipos enumerados en a), b), c), d), e), f), g), h) o i), por ejemplo, identificar la presencia de un subtipo específico en un grupo de subtipos.

En otro aspecto particular, el tipo general de virus de la hepatitis puede ser virus A, B y C presentando posiblemente cada virus varios subtipos incluyendo cepas mutantes. En una forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la hepatitis incluye el examen para determinar virus de la hepatitis A, B y/o C mientras que la identificación del subtipo de virus de la hepatitis incluye el examen para determinar subtipos o cepas mutantes de virus de la hepatitis A, B y, respectivamente. En otra forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la hepatitis incluye el examen para determinar virus de la hepatitis B mientras que la identificación del subtipo de virus de la hepatitis incluye el examen para determinar uno o más subtipos y/o cepas mutantes del virus de la hepatitis B. Aún en otra forma de realización, la identificación del tipo general de virus de la hepatitis incluye el examen para determinar el virus de la hepatitis C mientras que la identificación del subtipo de virus de la hepatitis incluye el examen para determinar uno o más de los subtipos 1-9 del virus de la hepatitis tipo C.

En diversas formas de realización, los procedimientos y el aparato de la invención pueden detectar uno o más agentes infecciosos diferentes. Por ejemplo, un instrumento de toma de muestras puede comprender una pluralidad de diferentes anticuerpos, en el que están presentes múltiples subgrupos de anticuerpos, mediante lo cual cada subgrupo de anticuerpos se une específicamente a un agente infeccioso diferente. Por ejemplo, una pluralidad de anticuerpos puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 subgrupos, en la que cada subgrupo de anticuerpos en la pluralidad de anticuerpos se une específicamente a un agente infeccioso diferente. En algunas formas de realización, los procedimientos y el aparato de la invención detectan un agente infeccioso pandémico y no pandémico. En una forma de realización, los agentes infecciosos pandémicos y no pandémicos son virus influenza.

La naturaleza explosiva de la gripe epidémica y las características clínicas específicas de esta enfermedad han proporcionado registros epidemiológicos fiables de esta infección desde el inicio del siglo XIX. Se registraron varias epidemias durante el siglo XIX pero la primera pandemia no se registró con precisión hasta 1889-92. Una segunda pandemia, que se originó probablemente en Europa, se produjo en 1918-19, y se conoce como la gripe española, que fue responsable de 20-25 millones de muertes, principalmente en adultos jóvenes.

Continuaron produciéndose pandemias regularmente tras la gripe española, en 1932-33, 1947-48, 1957 y 1968. Se cree que la siguiente pandemia se está retrasando. Estas últimas pandemias se asemejaron a la pandemia de 1890, afectando a millones de personas con una leve URTI y un pequeño número de muertes. Los virus H1N1 (porcinos) aparecieron probablemente en 1918 y continuaron circulando hasta 1957, momento en el que se suplantaron por los virus H2N2 (asiáticos). Los virus H2N2 fueron prevalentes hasta 1968, cuando aparecieron las cepas H3N2 (Hong Kong). El virus H1N1 volvió a aparecer en 1977 y no sustituyó el subtipo H3N2 y ambos subtipos continuaron circulando conjuntamente. Por tanto, es imperativo que se examine a los sujetos de manera eficaz y precisa para determinar con qué cepa y/o subtipo está infectado un individuo. Además, en algunas circunstancias, tal recogida y procesamiento de muestras se producirá necesariamente en un entorno de punto de atención (por ejemplo, en el campo, sin grandes números de sujetos de lo que tomar y procesar muestras, y con mano de obra limitada para realizar tal toma de muestras).

Como tal, en una forma de realización, los procedimientos y el aparato de la invención se utilizan en el procesamiento de un gran número de muestras, en un entorno de punto de atención, en el que pueden visualizarse los resultados de prueba (es decir, leerse) cierto periodo de tiempo tras completarse la prueba. Por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser de 30 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 4 horas o 5 horas. En algunas formas de realización, el aparato proporciona alta sensibilidad y especificidad cuando el resultado fluorescente puede leerse con resultados muy similares a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Por tanto, en algunas formas de realización pueden recogerse y procesarse muestras biológicas, pero apartarse para leerse un tiempo significativo más tarde, lo que es muy ventajoso en entornos de punto de atención o cuando se recoge un

gran número de muestras con mano de obra o tiempo limitado para procesar adicionalmente las muestras.

Aún en otro aspecto de la descripción, las composiciones y los procedimientos de la invención se dirigen a la detección de uno cualquiera o más analitos presentes en una muestra. Tal como se indicó anteriormente, por ejemplo, utilizando diferentes restos de unión que se unen específicamente a marcadores asociados con un estado, pueden detectarse uno o más analitos asociados con IM. Por tanto, un dispositivo de prueba y SCD puede comprender los reactivos necesarios para diagnosticar una enfermedad o estado patológico, distinto a enfermedades infecciosas.

En algunas divulgaciones, el uno o más analitos son marcadores asociados con un estado patológico o una enfermedad. En otra forma de realización, el uno o más analitos son polipéptidos asociados con una condición o estado nutricional. Aún en otras formas de realización, el uno o más analitos son marcadores celulares asociados con el crecimiento y el ciclo celular. En otra forma de realización, el uno o más analitos se asocian con la proliferación y diferenciación celular. En una forma de realización, los marcadores celulares se asocian con cáncer.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Volumen de ensayo y tampón de detección

Explorar el volumen de muestra de ensayo óptimo que proporcionará la mejor sensibilidad y para investigar si un tampón de detección también aumentará la sensibilidad y el rendimiento de la tira de prueba.

Materiales: Membrana de nitrocelulosa: membrana Millipore HiFlow 135, 2,5 cm de anchura. N.º de cat. SHF1350425, n.º de lote R68N46849, n.º de código RK04414, n.º de rollo 04OLI. Se sembró en estrías la membrana con anticuerpo monoclonal anti-H5N1, clon 3C8 a 1,0 mg/ml. Se sembró en estrías la línea de control con anticuerpo de conejo antirratón 1,5 mg/ml. Almohadilla de mecha: almohadilla de poliéster tratada con Tween 20 al 0,05%, grado Ahlstrom 6613. Almohadilla absorbente preparada: papel de grado Ahlstrom 222, 3,5 cm de anchura, adquirida de Fisher, n.º de cat. 2228-1212, n.º de lote 6150502. Se preparó conjugado de 3G4 anti-H5-oro por Nanogen POC en Toronto, Canadá, la DO del conjugado de 3G4-oro en el pico de absorción máxima fue de 112,54. Tampón de extracción: Tris-Cl 50 mM, pH 8,15, NaCl 0,75 M, BSA al 1%, Pluronic F68 al 0,1%, caseína digerida al 0,05%, TCEP 2 mM y NaN₃ al 0,02%. La hemaglutinina H5 recombinante (0,2 mg/ml) la proporcionó Nanogen POC, Toronto, Canadá

Protocolo: Preparación de tira de prueba de lateral flujo. Se laminó la membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con anticuerpos sobre una tarjeta de plástico con 1-2 mm de solapamiento con la almohadilla de mecha y la almohadilla absorbente. No se aplicó cinta de cobertura sobre ningún componente. Se cortaron tiras de 5 mm de anchura.

Prueba: El tampón de extracción que osciló entre 50 - 100 µl se mezcló con 1,1 µl de conjugado de 3G4-oro y con o sin 2 µl de hemaglutinina H5 recombinante. Se inició la prueba insertando la tira en tampón de extracción y se barrió el resultado a los 15 min., 20 min., 25 min. y 30 min. Para el experimento con tampón de detección, véase el resultado para más detalle.

Resultado: Figura 9 Prueba de las tiras con diferente volumen de tampón de extracción, a los 15, 20, 25 y 30 minutos. Figura 9a, se sometieron a prueba tiras de prueba en diferente volumen de tampón de extracción. A los 15, 20, 25 y 30 min., se sacaron las tiras y se barrieron con el densitómetro calibrado GS-800 de Bio-Rad. carriles 1, 2: 50 µl de tampón de extracción; carriles 3, 4: 60 µl de tampón de extracción, carriles 5, 6: 70 µl de tampón de extracción, carriles 7, 8: 80 µl de tampón de extracción; carriles 9, 10: 100 µl de tampón de extracción; figura 9B, comparar la intensidad de línea de prueba de la tira de prueba con diferente volumen de tampón de extracción en diferente tiempo de lectura.

Tabla 6. Análisis de datos de la figura 9 con Quantity One.

Número de carril	Tampón de extracción (µl)	Intensidad de pico			
		15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
1	50	55,6	62,3	63,1	62,5
2		51,1	57,3	55,4	62,6
3		53,5	65,7	68,5	68,9
4	60	51,6	63,8	66,2	66,5
5		45,6	57,9	60,4	60,7
6		42,1	57,0	61,7	63,9
7	80	39,6	53,7	59,8	61,5
8		42,9	57,9	64,7	65,4
9	100	35,2	49,2	54,6	55,6
10		30,8	44,9	49,3	49,8

Figura 10A Prueba de la tira n.º 3 con diversas cantidades de tampón de extracción y el efecto de una limpieza de fondo sobre su resultado de control negativo.

5 Tabla 7. Análisis de datos de la figura 10 con el software Quantity One.

Número de carril	Tampón de extracción (µl)	Intensidad de pico	
		15 min.	20 min.
1	50	3,8	5,4
2		4,1	4,6
3	60	3,4	4,8
4		3,4	5,5
5	70	3,4	2,9
6		2,7	4,1

10 A diversas cantidades de tampón de extracción, se les añadió 1,1 µl de conjugado de 3G4-oro. Se inició la prueba insertando la tira en la disolución de ensayo y se barrió a los 15 min. (Primer rollo). Entonces se transfirieron todas las tiras a tubos que contenían tampón de extracción sólo y se ejecutaron durante 5 minutos más. Se barrieron las tiras de nuevo. (Segundo rollo).

15 Figura 10B Prueba de la tira n.º 3 en diversas cantidades de tampón de extracción y el efecto de una limpieza de fondo sobre su sensibilidad.

A diversas cantidades de tampón de extracción, se les añadió 1,1 µl de conjugado de 3G4-oro y 2 µl de hemaglutinina H5 recombinante. Se inició la prueba insertando la tira en la disolución de ensayo y se barrió a los 15 min. (Primer rollo). Entonces se transfirieron todas las tiras a tubos que contenían tampón de extracción sólo y se ejecutaron durante 5 minutos más. Se barrieron las tiras de nuevo. (Segundo rollo).

20 Tabla 8. Análisis de datos de la figura 4 con el software Quantity One.

Número de carril	Tampón de extracción (µl)	Intensidad de pico		Cambio de intensidad
		15 min.		20 min.
1	50	56,9	88,7	56%
2		57,8	94,4	63%
3	60	50,2	78,3	56%
4		51,2	77,4	51%
5	70	46,8	67,1	43%
6		47,9	73,4	53%

25 *Discusión.* En el diseño de la mayor parte de las pruebas de flujo lateral rápido para punto de atención, habitualmente se seca un conjugado de anticuerpo sobre una almohadilla de conjugado que se interconecta con membrana de nitrocelulosa. La desventaja de este diseño es que el conjugado seco puede no liberarse uniforme y constantemente de una tira a otra, y de vez en cuando debido a materiales para la almohadilla de conjugado. A la inversa, si se premezcla el conjugado de anticuerpo con disolución de ensayo, siempre que el flujo de líquido sea constante, lo que es más probable que se produzca porque una vez que la almohadilla de mecha está húmeda, se controla realmente la velocidad de flujo por la membrana más que por el material de mecha, el flujo del conjugado de anticuerpo debe ser más constante y uniforme. Por tanto en el ejemplo anterior, se mezcló directamente el conjugado de anticuerpo-oro con disolución de ensayo.

35 Inicialmente, se utilizaron 100 µl de tampón de extracción para cada prueba y se fijó el tiempo de lectura del ensayo en 15 min. Se encontró que al final de los 15 min., no se consumieron todas las disoluciones de ensayo. Se produjo un desperdicio tanto de analito como de conjugado de oro. Se diseñó el experimento para investigar cuál es el volumen de ensayo óptimo en intervalos de tiempo de lectura relativamente cortos. La figura 9B y la tabla 2 mostraron que con mayor volumen, tal como 100 µl, de disolución de ensayo, se requiere más tiempo para obtener mejor sensibilidad. Sin embargo, con 50 µl de tampón de ensayo, la intensidad de color de la línea de prueba no aumenta mucho con respecto a diferentes tiempos de lectura tras 15 min., lo que indica que la mayor parte del analito y conjugado de oro han pasado la línea de captura a los 15 min. Aunque a los 30 min. la intensidad de color de las estrías sometidas a prueba con 100 µl de disolución de ensayo casi alcanzan el mismo nivel que las sometidas a prueba con un bajo volumen de disolución de ensayo a los 15 min., es obvio que una prueba de 15 min. es más competitiva que una prueba de 30 min. en el mercado.

45 Sin embargo, debido a la mayor concentración de conjugado de oro en un volumen relativamente pequeño de disolución de ensayo, el fondo de tiras de prueba mostró un fondo rojo significativo que redujo el contraste entre la línea de prueba y el fondo y era poco atractivo cosméticamente. La figura 10B mostró que ejecutando un tampón de

detección tras 15 min. podía limpiarse significativamente el fondo; y así aumentarse la sensibilidad de la prueba en el 43% - 63%. Los datos también demostraron de nuevo que un pequeño volumen de ensayo, 50 µl, es una mejor elección para la prueba.

5 Ejemplo 2 - Perla de europio frente a sistema de la técnica anterior

Materiales: virus de la gripe A inactivado: Texas 1/77 (H3N2) de Microbix Biosystems, Inc. n.º de cat. EL-13-02, n.º de lote 13037A3; virus de la gripe B inactivado: Hong Kong 5/72 de Microbix Biosystems, Inc. n.º de cat. EL-14-03, n.º de lote 14057A2; prueba Quidel QuickVue A+B, n.º de lote 702391

Protocolo: Dilución de virus - Se diluyeron preparaciones virales de virus de la gripe A y virus de la gripe B con solución salina hasta 4096 HA/ml y 409,6 HA/ml, respectivamente, antes de su utilización. Procedimiento de ensayo: Se siguieron los procedimientos descritos en el prospecto del kit de prueba Quidel y revisados brevemente en la presente memoria. Dispensar todo la disolución de reactivo de extracción del tubo de reactivo. Girar suavemente el tubo para disolver su contenido. Añadir una concentración conocida de virus en el tubo. Colocar el hisopo en el tubo de extracción. Deslizar el hisopo al menos tres veces mientras se presiona la cabeza contra el fondo y el lateral del tubo de extracción. Dejar el hisopo en el tubo durante 1 min. Deslizar la cabeza del hisopo contra el interior del tubo a medida que se retira. Colocar la tira de prueba en el tubo de extracción. Leer el resultado a los 10 min.

Resultado: Figura 11 Prueba de la gripe A+B en QuickVue con diferente cantidad de virus de la gripe A, Texas 1/77. Se muestra la línea de prueba por encima de la línea control.

Tabla 9. Análisis de datos y resultados de lectura visual de la figura 4 con el software Quantity One.

Virus de la gripe A (HA/prueba)	N.º de carril	Intensidad de pico	Resultado de lectura visual
0	1	2,5	-
	2	1,9	-
1,0	3	3,1	-
	4	3,1	-
2,0	5	3,0	-
	6	3,9	-
4,1	7	7,2	+
	8	8,7	+
8,2	9	18,2	+
	10	14,3	+
16,4	11	21,1	+
	12	31,9	+
32,8	13	66,2	+
	14	48,1	+
65,5	15	56,8	+
	16	74,0	+

Se analizó la intensidad de pico con el software Quantity One. Se facilitaron los valores por el software. Cualquier valor por debajo de 4 se leerá como negativo a simple vista.

Figura 12 Prueba de la gripe A+B en QuickVue con diferente cantidad de virus de la gripe B, Hong Kong 5/72.

La línea de prueba para el tipo B está por debajo de la línea control.

Tabla 10. Análisis de datos y resultados de lectura visual de la figura 4 con el software Quantity One.

Virus de la gripe A (HA/prueba)	N.º de carril	Intensidad de pico	Resultado de lectura visual
0	1	2,9	-
	2	0,2	-
0,41	3	1,6	-
	4	1,9	-
0,82	5	2,3	-
	6	3,5	-
1,64	7	4,2	±
	8	6,3	+
3,28	9	2,0	-
	10	8,1	+
6,55	11	16,3	+
	12	14,0	+

Se analizó la intensidad de pico con el software Quantity One. Se facilitaron los valores por el software. Cualquier valor por debajo de 4 producirá un resultado negativo con una lectura visual.

5 Tabla 11. Prueba de la gripe A+B en QuickVue con diferente cantidad de virus de la gripe B, Hong Kong 5/72

Virus (HA/prueba)	0		0,41		0,82		1,64	
N.º	1	2	1	2	1	2	1	2
Resultado visual	-	-	±	±	±	±	+	+

Ejemplo 3 - Prueba del límite de detección de la prueba de virus de la gripe A y B utilizando marcador de oro

10 **Materiales:** Se preparó conjugado de M4090913 antigripe A-oro por Nanogen POC en Toronto, Canadá. La DO fue de 102,69 en el pico de absorción máxima. Se preparó conjugado de anticuerpo 2/3 antigripe B-oro por Nanogen POC en Toronto, Canadá. La DO fue de 94,78 en el pico de absorción máxima. Véase anteriormente para la membrana de nitrocelulosa, la almohadilla de mecha y la almohadilla absorbente. Se sembró en estrías la membrana con anticuerpo M2110171 antigripe B a 1,5 mg/ml y se preparó anticuerpo de conejo antirratón a 1,5 mg/ml por Nanogen POC en Toronto, Canadá. Se sembró en estrías la membrana con anticuerpo 7304 antigripe A a 1,5 mg/ml y se preparó anticuerpo de conejo antirratón a 1,5 mg/ml por Nanogen POC en Toronto, Canadá. Se adquirió virus de la gripe A H3N2, Texas 1/77 inactivado de Microbix Biosystems, Inc. n.º de lote 13037A3, 40960 HA/ml.

20 Se adquirió virus de la gripe B, Hong Kong 5/72 inactivado de Microbix, Biosystems, Inc., n.º de lote 14057A2, 40960 HA/ml; agua para biología molecular, n.º de lote 318105; tampón de extracción 3x que contenía Tris-Cl 0,15 M, pH 8,0, NaCl 2,25 M, Pluronic F68 al 0,3%, BSA al 3%, TCEP 6 mM, caseína digerida al 1,5% y NaN₃ al 0,06%; tampón de extracción 2x que contenía Tris-Cl 0,1 M, pH 8,0, NaCl 1,5 M, Pluronic F68 al 0,2%, BSA al 2%, TCEP 4 mM, caseína digerida al 1% y NaN₃ al 0,04%; tampón de extracción 1x, n.º de lote 2232-003.

25 **Protocolo:** Preparación de tira de prueba de lateral flujo (véase anteriormente); dilución de virus: se diluyó virus de la gripe A, Texas 1/77 inactivado hasta 409,6 HA/ml con PBS 10 mM con BSA al 1%. se diluyó virus de la gripe B, Hong Kong 5/72 inactivado hasta 40,96 HA/ml con el mismo tampón antes de su utilización. Prueba de virus de la gripe A y B con conjugado de oro: para la prueba de virus de la gripe A, se añadieron 16,7 µl de tampón de extracción 3x, 1,95 µl de conjugado de M4090913-oro y diferente cantidad de virus de la gripe A inactivado a un tubo. Se añadió H₂O hasta un volumen final de 50 µl. Para la prueba de virus de la gripe B, se añadieron 25 µl de tampón de extracción 2x, 2,12 µl de conjugado de 2/3-oro y diferente cantidad de virus a un tubo. Se añadió H₂O hasta un volumen final de 50 µl. Se inició la prueba insertando la tira de prueba en la disolución de ensayo. A los 15 min., se añadieron 50 µl de tampón de extracción 1x al mismo tubo y se siguió con la prueba durante 5 minutos más. Se leyeron los resultados en las tiras a simple vista y también se analizaron con el software Quantity One tras barrerse las tiras con el densitómetro calibrado GS-800 de Bio-Rad.

Resultado: Figura 13. Prueba del límite de detección de la prueba de virus de la gripe A utilizando oro como marcador.

40

Tabla 12. Análisis de datos de la figura 7 con el software Quantity One y resultado de lectura visual

HA de virus/prueba	N.º de carril	Intensidad de pico	Intensidad de pico (prom.)	Lectura visual
0	1	0	0	-
	2	0		
0,105	3	2,2	2,8	-
	4	3,3		
0,21	5	4,8	6,7	+
	6	8,6		
0,41	7	13,2	11,2	+
	8	9,1		
0,82	9	14,8	14,1	+
	10	13,5		
1,64	11	26,4	24,5	+
	12	22,5		

Los valores de intensidad de pico son el resultado del análisis con Quantity One.

45

Figura 14 Prueba del límite de detección de la prueba de virus de la gripe B utilizando oro como marcador.

Tabla 13. Análisis de datos de la figura 9 con el software Quantity One y resultado de lectura visual

HA de virus/prueba	N.º de carril	Intensidad de pico	Intensidad de pico(prom.)	Lectura visual
0	1	2,2	2,18	-
	2	2,2		
0,021	3	2,8	2,78	-
	4	2,7		
0,041	5	4,8	4,67	±
	6	4,6		
0,082	7	7,3	7,76	+
	8	8,2		
0,164	9	14,4	13,83	+
	10	13,3		

Los valores de intensidad de pico son el resultado del análisis con Quantity One.

Ejemplo 4 - Prueba del límite de detección de la prueba de virus de la gripe A y B utilizando conjugado de europio fluorescente

Materiales: Almohadilla de mecha: almohadilla de poliéster tratada con Tween 20 al 0,05%, 1,4 cm de anchura proporcionada por Nanogen POC en Toronto, Canadá; almohadilla absorbente: papel de grado Ahlstrom 222, 3,5 cm de anchura, adquirida de Fisher, n.º de cat. 2228-1212, n.º de lote 6150502; membrana de nitrocelulosa: membrana Millipore HiFlow 135, 2,5 cm de anchura. N.º de cat. SHF1350425, n.º de lote R68N46849, n.º de código Erk04414, n.º de rollo 04OLI; membrana para gripe A: se sembraron en estrías anticuerpo 7304 antigripe A de Medix 1,5 mg/ml en la línea de prueba e IgG de conejo antirratón 1,5 mg/ml en la línea control en Nanogen POC, Toronto, Canadá; se preparó conjugado de M4090913 antigripe A de Fitzgerald-europio a la concentración de perlas del 1% en Nanogen POC, Toronto, Canadá; membrana para gripe B: se sembraron en estrías anticuerpo 9901 antigripe B de Medix 1,5 mg/ml en la línea de prueba e IgG de conejo antirratón 1,5 mg/ml en la línea control en Nanogen POC, Toronto, Canadá; membrana para gripe B: se sembraron en estrías anticuerpo M2110171 antigripe B 1,5 mg/ml en la línea de prueba e IgG de conejo antirratón 1,5 mg/ml en la línea control en Nanogen POC, Toronto, Canadá; se preparó conjugado de 2/3 antigripe B de HyTest-europio a la concentración de perlas del 1% en Nanogen POC, Toronto, Canadá; virus de la gripe A inactivado: Texas 1/77 (H3N2) de Microbix Biosystems, Inc. n.º de cat. EL-13-02, n.º de lote 13037A3; virus de la gripe B inactivado: Hong Kong 5/72 de Microbix Biosystems, Inc. n.º de cat. EL-14-03, n.º de lote 14057A2; se preparó tampón de extracción 3x que contenía Tris-Cl 0,15 M, pH 8,0, NaCl 2,25 M, BSA al 3%, Pluronic al 0,3%, NaN₃ al 0,06%, caseína digerida al 1,5% y TCEP 6 mM, en Nanogen, San Diego. n.º de lote 2232-001; tampón de dilución de virus: PBS 10 mM con BSA al 1%; tampón de dilución de conjugado de anticuerpo-europio: PBS 10 mM, BSA al 1% y Tween-20 al 0,2%.

Protocolos. Preparación de la tira de prueba de lateral flujo: Se laminó la membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con anticuerpos sobre una tarjeta de plástico con 1-2 mm de solapamiento entre la almohadilla de mecha y el extremo de la tira de nitrocelulosa con la almohadilla absorbente. No se aplicó cinta de cobertura sobre ningún componente. Se cortaron tiras de 5 mm de anchura. Dilución de los virus: se diluyeron controles positivos de virus de la gripe A y virus de la gripe B inactivados hasta 409,6 unidades de HA/ml y 4096 unidades de HA/ml, respectivamente para el ensayo con la prueba de virus influenza.

Pretratamiento con conjugado de anticuerpo-europio: se sonicó conjugado de anticuerpo-europio al 1% en un sonicador de baño durante 4 min. Entonces se diluyó una cantidad de perlas conjugadas hasta el 0,04% con tampón de dilución de anticuerpo-europio y se sonicó durante otros 4 min.

Procedimiento de prueba de virus de la gripe A y B con conjugado de anticuerpo-europio: a 16,67 µl de tampón de extracción 3x en un tubo de prueba, añadir 5 µl de conjugado de anticuerpo-europio al 0,04% y diferente cantidad de virus. Añadir agua hasta un volumen final de 50 µl. Insertar una tira de prueba de lateral flujo en la disolución de ensayo. Esperar 15 min. a temperatura ambiente. Añadir 50 µl de tampón de extracción 1x al mismo tubo de prueba. Esperar durante 5 min. a temperatura ambiente. Colocar la tira de prueba de lateral flujo en una bandeja y medir la intensidad de fluorescencia. Se ejecutó cada condición de prueba con 5 duplicados.

Resultados: Figura 15 Sensibilidad analítica de prueba de la gripe A utilizando conjugado de europio

Tabla 14. Análisis estadístico de datos sin procesar para determinar la sensibilidad analítica de la prueba de la gripe A utilizando conjugado de europio

unidades de HA	Duplicados					Prom.	CV
	1	2	3	4	5		
0	568	677	629	620	650	629	6,4%
0,021	1350	1241	1256	1308	1216	1274	4,2%

0,041	1777	1535	1727	1595	1364	1600	10,2%
0,082	2171	2336	2438	2114	2336	2279	5,8%
0,123	4176	3745	3558	3410	3765	3731	7,7%
0,164	3989	3917	3963	4050	4489	4082	5,7%
0,328	8866	9979	8497	8304	7783	8686	9,5%

Figura 16 Prueba de la sensibilidad analítica de la prueba de la gripe B utilizando conjugado de europio y Medix 9901 en la membrana

- 5 Tabla 15. Análisis estadístico de datos sin procesar para determinar la sensibilidad analítica de la prueba de la gripe B utilizando conjugado de europio

unidades de HA	Duplicados					Prom.	CV
	1	2	3	4	5		
0	284	196	330	360	331	300	21,4%
0,021	1419	1361	1572	1600	1496	1490	6,8%
0,041	1430	1467	1611	1746	1626	1576	8,1%
0,082	2321	2520	2539	3312	1690	2476	23,4%
0,123	2580	2791	2661	2737	2781	2710	3,3%
0,164	5590	5111	5058	5639	5809	5441	6,2%
0,328	8699	10903	10047	10491	9796	9987	8,4%

- 10 Figura 17 Prueba de la sensibilidad analítica de prueba de la gripe B utilizando conjugado de europio y M2110171 en la membrana

Tabla 16. Análisis estadístico de datos sin procesar para determinar la sensibilidad analítica de la prueba de la gripe B utilizando conjugado de europio

unidades de HA	Duplicados					Prom.	CV
	1	2	3	4	5		
0	511	501	532	481	446	494	6,6%
0,0021	1368	1280	1458	1420	1395	1384	4,9%
0,0041	2697	2535	2708	2677	2711	2666	2,8%
0,0082	3412	3198	3817	3930	3609	3593	8,5%
0,0123	6531	6560	6294	7290	6055	6546	7,1%
0,0164	6707	7328	6679	6853	8098	7133	8,4%
0,0328	12016	13162	12597	12907	13555	12847	4,5%

- 15 **Resultados:** las tablas 5 a 7 muestran que el líder actual del mercado de inmunoensayo de virus de la gripe rápido, la prueba de la gripe A+B QuickVue de Quidel presenta un límite de detección de 4,1 unidades de HA para virus de la gripe A Texas 1/77 y de 1,6 unidades de HA para virus de la gripe B Hong Kong 5/72. Cuando se utiliza marcador de oro, la prueba rápida de virus de la gripe de la presente invención puede detectar al menos 0,41 HA de virus de la gripe A Texas 1/77 y 0,082 HA de virus de la gripe B Hong Kong 5/72 cuando se utilizaron tampón de detección y volumen de ensayo limitado. Esto es 10 y 20 veces más sensible que para gripe A+B en QuickVue de Quidel en la detección del virus de la gripe A Texas 1/77 y el virus de la gripe B Hong Kong 5/72, respectivamente. Aplicando conjugado de europio fluorescente, la presente prueba rápida de virus de la gripe puede detectar tan sólo 0,021 unidades de HA de virus de la gripe A Texas 1/77 con una razón señal/ruido (S/N, *signal/noise*) de 2,03 y 0,0021 unidades de HA de virus de la gripe B Hong Kong 5/72 con una razón S/N de 4,96. Si se considera una razón S/N de 2 el límite de detección para el ensayo basado en europio, podría detectarse la gripe B hasta 0,001 unidades de HA/prueba. O bien, una mejora en la sensibilidad con respecto al ensayo de Quidel para el tipo B de aproximadamente 1600 veces. Este estudio demuestra claramente que las mejoras realizadas en la tecnología de ensayo de nitrocelulosa ensayo sí que produce una mejora significativa en el rendimiento del ensayo de POC.

Ejemplo 5

- 35 Resultados de pruebas de laboratorio para demostrar la prueba de principio preliminar de que puede diferenciarse virus de la gripe H5N1 de virus de la gripe humanos estacionales utilizando los instrumentos y el diseño de productos propuestos.

- 40 **Materiales:** tampón de extracción 3x que contenía Tris-Cl 0,15 M, pH 8,0, NaCl 2,25 M, Pluronic F68 al 0,3%, BSA al 3%, caseína al 1,5% y NaN₃ al 0,06%, n.º de lote 2232-001; tampón de extracción 1x, n.º de lote 2232-003; clorhidrato de tris(carboxietil)fosfina 0,2 M (TCEP), n.º de lote 2232-078; agua para biología molecular, n.º de lote 318105; tampón de dilución de europio, n.º de lote RC 6-8-06; PBS 10 mM, pH 7,2 con BSA al 1%, n.º de lote HR 7-19-06; conjugado de 2/3 de HyTest-europio al 1% con 0,025 mg de anticuerpo, n.º de lote E2/3-270706-2; conjugado de M4090913-europio al 1% con 0,025 mg de anticuerpo, n.º de lote E13-270706-2; conjugado de 3C8 europio al 1%

con 0,1 mg anticuerpo, n.º de lote E3C8-180806; se preparó membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con anticuerpos A60010044P antigripe A, 9901 antigripe B, 3G4 anti-H5 y anticuerpo de conejo antirratón por Nanogen POC, Toronto, Canadá. La concentración de recubrimiento de anticuerpo era de 2,0 mg/ml para las tres líneas de prueba. La concentración de recubrimiento de anticuerpo para la línea control era de 1,5 mg/ml. La distancia entre cada línea de prueba, y línea de prueba y control línea es de 5 mm $\pm$ 0,5 mm; almohadilla de mecha: almohadilla de poliéster tratada con Tween 20 al 0,05%, 1,4 cm de anchura proporcionada por Nanogen POC en Toronto, Canadá; almohadilla absorbente: papel de grado Ahlstrom 222, 3,5 cm de anchura, adquirida de Fisher, n.º de cat. 2228-1212, n.º de lote 6150502; se adquirió virus de la gripe A H1N1, Beijing/262/95 inactivado de NIBSC, actividad de 40 µg de HA/ampolla; Se adquirió virus de la gripe A H3N2, Texas 1/77 inactivado de Microbix Biosystems, Inc. n.º de lote 13037A3, 40960 HA/ml; virus de la gripe H5N1, Ck/HK/Yu22/02 inactivado de Wantai en China; se adquirió virus de la gripe B, Hong Kong 5/72 inactivado de Microbix, Biosystems, Inc., n.º de lote 14057A2, 40960 HA/ml; virus Epstein-Barr adquirido de ATCC, VR-1491, cepa B98-8, n.º de lote 3605034

Procedimientos: Preparación de tira de pruebas de virus de la gripe con múltiples líneas de prueba: se laminó la membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con anticuerpos sobre una tarjeta de plástico con 1-2 mm de solapamiento con la almohadilla de mecha y la almohadilla absorbente. No se aplicó cinta de cobertura sobre ningún componente. Se cortaron tiras de 5 mm de anchura; se diluyeron virus de la gripe A H3N2, Texas 1/77 y virus de la gripe B, Hong Kong 5/72 inactivados 10 y 100 veces, respectivamente, con PBS 10 mM/BSA al 1%; se reconstituyó H1N1 Beijing 262/95 inactivado con 1 ml de H₂O; se sonicó conjugado de anticuerpo-europio al 1% durante 4 min. con sonicador de baño Branson 1210. Entonces se diluyó el conjugado individual hasta el 0,04% con conjugado de tampón de dilución de europio y se sonicó 3 veces con 4 min. cada vez en baño de hielo. En algunos experimentos, se diluyeron juntos los tres conjugados de europio en el mismo tubo. En este caso, la concentración de cada conjugado de anticuerpo-europio era todavía de perlas al 0,04%; preparación de ensayo:

Para cada ensayo, se añadieron los siguientes componentes a un tubo: 16,67 µl de tampón de extracción 3x; 0,5 µl de TCEP 0,2 M; 5 µl de conjugado de europio diluido si se diluyeron todos los conjugados de europio el mismo tubo o 15 µl de conjugado de europio (5 µl de cada uno si se diluyó el conjugado de europio individual por separado); virus tal como se indica en las figuras; ajustar el volumen final a 50 µl con H₂O.

Prueba: Se inició la prueba insertando la tira de prueba en la disolución de ensayo. Tras 15 min., se añadieron 50 µl de tampón de extracción 1x al tubo de prueba y se siguió con la prueba durante otros 5 min. A los 20 min., se leyó el resultado de la tira de prueba con un lector de fluorescencia. Se repitió cada prueba 3 veces.

Resultados: Figura 18 imágenes de tiras de prueba rápidas de virus de la gripe bajo luz UV tras someterse a prueba las tiras con tampón, virus de la gripe A subtipo H3N2, H1N1 y H5N1, virus de la gripe tipo B y virus Epstein-Barr.

Figura 19 Prueba de la prueba rápida de virus de la gripe con tampón sólo

Figura 20 Prueba de la prueba rápida de virus de la gripe con virus de la gripe A subtipo H3N2, Texas 1/77

Figura 21 Prueba de la prueba rápida de virus de la gripe con virus de la gripe tipo B

Figura 22 Prueba de la prueba rápida de virus de la gripe con virus de la gripe A subtipo H5N1, Ck/HK/Yu22/02

Figura 23 Prueba de la prueba rápida de virus de la gripe con virus de la gripe A subtipo H1N1 Beijing/262/95

Figura 24 Prueba de la prueba rápida de virus de la gripe con H5N1 y virus de la gripe tipo B

Figura 25 Prueba de la prueba rápida de virus de la gripe con virus Epstein-Barr

Resultados: basándose en los resultados de prueba iniciales, se ha seleccionado anticuerpos para detectar virus de la gripe tipo A, tipo B y subtipo H5. Se prepararon tiras con tres líneas de prueba diferentes que detectaban tipo A, tipo B y subtipo H5, respectivamente. Los resultados en las figuras 1 a 7 muestran que cuando se somete a prueba la gripe B, sólo se observa el pico de la gripe B. Cuando se somete a prueba o bien H1N1 o bien H3N2, sólo se observa el pico de la prueba de la gripe A y no se observa el pico correspondiente al subtipo H5. Basándose en una realización en la presente memoria, se sembrará en estrías otra línea de prueba correspondiente a H1 y H3 (juntos) en la membrana una vez que se seleccionan los anticuerpos anti-H1 y H3. Entonces también se observará otro pico correspondiente a H1/H3 además del pico de la gripe A. Cuando se sometió a prueba el subtipo H5N1, se observan tanto el pico de la gripe A como el pico de H5, mostrando el pico de la gripe A una señal más intensa que el pico de H5. Se esperaba este resultado ya que se optimizan la optimización adicional de la selección de AcM y la carga de anticuerpos y otros factores dentro del ensayo. No se observó reacción cruzada de la prueba de virus de la gripe con el virus EB. Estos resultados muestran claramente que el enfoque descubierto en la presente memoria puede producir resultados de prueba de múltiples analitos sin interferencia entre las líneas de prueba.

Los resultados mostrados anteriormente han demostrado claramente que se ha descubierto una nueva tecnología

de POC totalmente integrada que es altamente sensible y puede detectar independientemente diferentes tipos y subtipos virales en la misma tira de prueba.

Ejemplo 6. Ensayo rápido de la gripe B utilizando pARN como captura.

Se fijó pARN en la membrana para determinar la eficacia para la captura de pARN complementario conjugado con anticuerpo anti-nucleoproteína de virus de la gripe B, para generar una señal cuando está presente virus tipo B en la muestra y se forma un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

Materiales: almohadilla de mecha: almohadilla de poliéster tratada con Tween 20 al 0,05%, 1,4 cm de anchura proporcionado por Nanogen POC en Toronto, Canadá; almohadilla absorbente: papel de grado Ahlstrom 222, 3,5 cm de anchura, adquirida de Fisher, n.º de cat. 2228-1212, n.º de lote 6150502 ; membrana de nitrocelulosa: membrana Millipore HiFlow 135, 2,5 cm de anchura. N.º de cat. SHF1350425, n.º de lote R68N46849, n.º de código RK04414, n.º de rollo 04OLI; membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con M2110171 1,5 mg/ml, n.º de lote M083106; membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con 1,35 mg/ml 102a4-5G4, n.º de lote MZ-42-74247-pRNA135; se preparó conjugado de 2/3 antigripe B de HyTest-europio a la concentración de perlas del 1% en Nanogen POC, Toronto, Canadá, n.º de lote E2/3-270706-3; virus de la gripe B inactivado: Hong Kong 5/72 de Microbix Biosystems, Inc. n.º de cat. EL-14-03, n.º de lote 14057A2; se preparó tampón de extracción 3x que contenía Tris-Cl 0,15 M, pH 8,0, NaCl 2,25 M. BSA al 3%, Pluronic al 0,3%, NaN₃ al 0,06%, caseína digerida al 1,5% y TCEP 6 mM, en Nanogen, San Diego. n.º de lote 2232-001; TCEP 0,2 M, n.º de lote 2232-078; tampón de extracción 1x, n.º de lote 2232-003; conjugado de tampón de dilución de europio, n.º de lote RC 6-8-06; tampón de dilución de virus: PBS 10 mM con BSA al 1%; PBS 10 mM, n.º de lote SP09-22-06; tampón de dilución de conjugado de anticuerpo-europio: PBS 10 mM, BSA al 1% y Tween-20 al 0,2%; proteína 5G4 para conjugación con pARN que se fijaría en la membrana; se adquirió M2110171 anti-nucleoproteína de la gripe B de Fitzgerald, n.º de lote 578; se sintetizaron pARN 102a4-amn y 102b4-amn (ambos de 13 meros) y se activaron mediante PDITC.

Protocolo:

Preparación de conjugados de pARN-anticuerpo

Tabla 17. Cálculo de las cantidades de oligo y anticuerpos requeridas para la conjugación.

Oligo		Conjugado con anticuerpo	Razón oligo/anticuerpo	Anticuerpo requerido
102a4amn	76,3 nmol	5G4	10:1	1,15 mg
102b4amn	54,7 nmol	M2110171	5:1	1,64 mg

Disolver pARN 102a4amn (229 nmol en total) y 102b4amn (164 nmol en total) activados en 150 µl de agua en dos tubos separados.

- Tomar una alícuota 50 µl en 3 tubos de microcentrífuga para cada pARN y secarlos utilizando un aparato Spin vac.
- Colocar 1,5 mg de anticuerpo monoclonal 5G4 en un filtro de centrifugación y 2,0 mg de anticuerpo monoclonal M2110171 en otro filtro de centrifugación para concentrar ambos anticuerpos. Se aclararon los anticuerpos con tampón borato de sodio 0,1 M. Se determinó la concentración final de 5G4 y M2110171 mediante la absorbancia a 280 nm y era de 33,35 mg/ml y 28,6 mg/ml, respectivamente
- Tomar 34 µl de 5G4 concentrado (1,15 mg) y 57 µl de M2110171 concentrado. Enrasar ambos a 65 µl con tampón borato 0,1 M.
- Añadir cada anticuerpo al pARN correspondiente y dejar que avance la reacción durante 15-20 horas a temperatura ambiente.
- Entonces se purificó el conjugado de pARN-anticuerpo con una columna Sephadex G-50 con un volumen de lecho de 7 ml equilibrada con PBS 0,01 M.

1. Preparación de membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con 102a4-5G4

Se sembró en estrías la membrana en NPOC en Toronto. Véase "Materiales".

3. Preparación de la tira de prueba de lateral flujo:

Se laminó la membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con anticuerpo o 102a4-5G4 sobre una tarjeta de plástico con 1-2 mm de solapamiento con la almohadilla de mecha en un extremo y 1-2 mm de solapamiento con la almohadilla absorbente en el otro extremo. Se cortaron tiras de 5 mm de anchura.

4. Dilución de los virus:

Se diluyó virus de la gripe B inactivado hasta 4,096 unidades de HA/ml con PBS 0,01 M y tampón BSA al 1%.

Pretratamiento con conjugado de anticuerpo-europio

Se sonicó conjugado de 2/3 antigripe B-europio al 1% en un sonicador de baño durante 4 min. Se diluyó entonces una cantidad de 10 µl de perlas conjugadas hasta el 0,02% con tampón de dilución de anticuerpo-europio y se sonicó durante 20 s utilizando un sonicador de sonda (modelo 550 de Fisher) al ajuste de potencia 2 para 4 pulsos, 5 s cada, con incubación de 10 s en hielo entre cada pulso.

Se diluyó 102b4-M2110171 (0,54 mg/ml tras purificación) hasta 0,1 mg/ml con PBS 10 mM.

Procedimiento de ensayo

Tomar 50 µl de mezcla de ensayo y añadirlo a un tubo de prueba. Insertar una tira de prueba en la mezcla de ensayo. Esperar 15 min. a temperatura ambiente. Añadir 50 µl de tampón de extracción 1x al mismo tubo de prueba e incubar durante otros 5 minutos. Leer la tira de prueba con un lector de fluorescencia LRE.

a. Preparar mezcla de ensayo para tiras con 102a4-5G4 sembrado en estrías

Tabla 18.

Unidades de HA de virus/prueba	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032
Componentes						
Tampón 3x (µl)	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7
Agua (µl)	52,1	50,8	49,6	47,1	42,1	32,1
TCEP 0,2 M (µl)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Conj. de 102b4-M2110171-pARN 0,1 mg/ml (µl)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Conj. de 2/3-europio al 0,02% (µl)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
4,096 unidades de HA de virus de la gripe B/ml (µl)	0,0	1,3	2,5	5,0	10,0	20,0
Vol. total para 2,5 pruebas (µl)	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0

b. Preparar mezcla de ensayo para tiras sembradas en estrías con anticuerpo M2110171 antigripe B

Tabla 19.

Unidades de HA de virus/prueba	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032
Componentes						
Tampón 3x (µl)	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7
Agua (µl)	57,1	55,8	54,6	52,1	47,1	37,1
TCEP 0,2 M (µl)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Conj. de 2/3-europio al 0,02% (µl)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
4,096 unidades de HA de virus de la gripe B/ml (µl)	0,0	1,3	2,5	5,0	10,0	20,0
Vol. total para 2,5 pruebas (µl)	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0

Resultado

Figura 30 A: Señales sin procesar de tiras de prueba con conjugado de 102a4-5G4 en las mismas.

Tabla 20. Altura de pico neta de las señales mostradas en la figura 30

Tabla 16.

Unidades de HA/prueba	1	2	Prom.	Señal/ruido
0	360,0	331,9	345,9	1,0
0,002	521,1	447,1	484,1	1,4
0,004	682,0	783,3	732,7	2,1
0,008	1048,5	916,2	982,4	2,8
0,016	1799,0	1594,3	1696,7	4,9
0,032	2745,4	3257,2	3001,3	8,7

Figura 30B: Señales sin procesar de tiras de prueba con anticuerpo M2110171 en las mismas.

Tabla 21. Altura de pico neta de las señales mostradas en la figura 30B

Unidades de HA/prueba	1	2	Prom.	señal/ruido
0	155,1	142,6	148,8	1,0
0,002	495,8	538,8	517,3	3,5
0,004	884,2	895,9	890,0	6,0
0,008	1633,7	1698,0	1665,8	11,2
0,016	3329,4	2574,9	2952,2	19,8
0,032	7203,1	6974,3	7088,7	47,6

Figura 31 Comparar la sensibilidad de dos tiras de prueba de la gripe B.

Los datos indican claramente que 1) pARN conjugado con una proteína, tal como anticuerpo 5G4 en este caso, puede fijarse en la membrana de nitrocelulosa; 2) pARN puede hibridarse con un oligo complementario conjugado con un anticuerpo en la membrana de nitrocelulosa; 3) el anticuerpo específico del analito todavía está funcionando tras conjugarse con pARN. El resultado ha demostrado que puede utilizarse un par específico de pARN como sistema de captura en ensayo rápido de flujo lateral.

Ejemplo 7. Detección de europio con lector

Se utilizaron seis concentraciones de europio de referencia diferentes para someter a prueba un lector (obsérvese que las siguientes referencias numéricas corresponden a las referencias utilizadas en las figuras: (1) 5×10^{-6} M; (5) 5×10^{-5} M; (3) 5×10^{-5} M; (6) 5×10^{-4} M; (2) 5×10^{-4} M y (4) 5×10^{-3} M. Se embutió el europio en material acrílico y se cortaron bloques de diferente tamaño para proporcionar diferentes concentraciones. Se proporcionan las mediciones como cuentas por metros $\times 10^{-4}$, figura 33.

En otro ejemplo, se montaron siete (7) trozos de patrones duros de 1 mm de ancho en centros de 4 mm, figura 34.

Ejemplo 8. Muestra de archivo.

Virus de la gripe: virus de la gripe A/Texas 1/77 (H3N2) inactivado a 40960 unidades de HA/ml de Microbix Biosystems, Inc. de Ontario, Canadá, número de catálogo EL-13-02; y virus de la gripe B/Hong Kong 5/72 inactivo a 40960 unidades de HA/ml de Microbix Biosystems, Inc. de Ontario, Canadá, número de catálogo EL-14-03.

Controles positivos de transcrito de ARN viral; control de ARN de virus de la gripe A, PN: 606161, LN: RH2174P73 a 50.000 copias/ μ l; y control de ARN de virus de la gripe B, PN: 606162, LN: RH2174P73 a 50.000 copias/ μ l

Tampón de extracción: tampón de extracción 3x

La tabla a continuación enumera la formulación del tampón de extracción 3x y el número de pieza, el número de lote y el proveedor correspondientes de cada uno de los componentes

Tabla 22.

Componente	Concentración	Proveedor	Número de catálogo	Número de lote
Base de Trizma	150 mM	Sigma	T-6791	58H5431
BSA	3%	SeraCare Life Science	AP-4500	013-05-015
Pluronic F68	0,3%	Pragmatics Inc.	Code 025	WPMS-561B
Caseína	1,5%	Sigma	C5890	075K0108
NaN ₃	0,06%	Sigma	S8032	125K2502
NaCl	2,25 M	Sigma	S7653	075K0024

Clorhidrato de tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP) 200 mM, preparado el 6-7-06 por HR, polvo pedido a PIERCE, número de producto: 20491, número de lote: GL102548

Preparar nuevo tampón de extracción 1x: combinar 200 μ l de tampón de extracción 3x con 6 μ l de TCEP 0,2 M y 394 μ l de agua para preparar 600 μ l de tampón de extracción 1x. La formulación del tampón de extracción 1x es: Tris 50 mM, BSA al 1%, Pluronic F68 al 1%, caseína al 0,5%, NaN₃ al 0,02%, NaCl 0,75 M y TCEP 2 mM.

Materiales de almacenamiento y unión de muestras: microtarjeta FTA Elute de Whatman, n.º de cat. WB120401, LN: FE6231106; punzón de 2,00 mm Harris UNI-CORE de Whatman, n.º de cat. WB640001, LN: 6023; y tubos de

reacción MicroAmp con tapas de 0,2 ml, PN: N801-0540, LN: P34H4QA11, ABI

Materiales de elución: agua destilada, libre de ADNasa, ARNasa, n.º de cat. 10977-015, LN: 1317578, Invitrogen

5 Fuente de calor: sistema de PCR GeneAmp 9700, ABI, QA2126

Material y reactivos de RT y PCR:

Tabla 23

10

Componente	Proveedor	Número de catálogo	Número de lote
Mezcla de RT	Prodesse	GLS01	050105RM
MgCl ₂ 1 M	Ambion	9530G	064R37A
Transcriptasa inversa VIMu, 50 u/μl	ABI	N808-0018	H03264
Inhibidor de ARNasa, 20 u/μl	ABI	N808-0119	H05526
Mezcla de cebadores de RVA	Nanogen	No disponible	RH2174P100
Polimerasa AmpliTaq Gold, 5 u/μl	ABI	N808-0249	G03670
Placa de reacción de PCR de 96 pocillos	ABI	4306737	P03F6QA41

Materiales para evaluar las reacciones de RT-PCR: reactivos DNA 1000 de Agilent: PN. 5067-1504, LN: 0623; y chips de ADN de Agilent: PN 5067-1522, LN: JA21BK01

15 Procedimientos

Preparación de mezcla maestra de RT

Tabla 24

20

Componente	Volumen por reacción (μl)
Mezcla de RT	11
MgCl ₂ 1 M	0,1
Transcriptasa inversa VIMu, 50 u/μl	1
Inhibidor de ARNasa, 20 u/μl	1
Agua libre de ADNasa, ARNasa	1,9
Total	15

Añadir 15 μl de mezcla maestra de RT en un pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos

Tabla 25.

25

Componente	Volumen por reacción (μl)
Mezcla de cebadores de RVA	39,5
Polimerasa AmpliTaq Gold (5 u/μl)	0,5
Total	40

Añadir 40 μl de la mezcla maestra de PCR en un pocillo de una placa de 96 pocillos

Tabla 26. Dilución de controles positivos de ARN: diluir ARN de virus de la gripe A y virus de la gripe B con agua libre de ADNasa, ARNasa tal como se describe en la tabla a continuación

30

Conc. inicial (copias/μl)	Conc. final (copias/μl)	Factor de dilución	μl de ARN	μl de agua	Volumen total	Copias/ reacción	Volumen restante
50.000	20.000	2,5	8	12	20	N/D	10
20.000	2000	10	10	90	100	10000	90
2000	200	10	10	90	100	1000	90
200	20	10	10	90	100	100	90
20	2	10	10	90	100	10	100

Añadir 5 μl de ARN diluido en la reacción de RT apropiada

35 Tabla 27. Dilución de virus inactivos influenza A e influenza B con tampón de extracción 1x

Conc. inicial (unidades de HA/ μ l)	Conc. final (unidades de HA/ μ l)	Factor de dilución	μ l de virus	μ l de tampón de extracción 1x	Volumen total	Unidades de HA/disco	Volumen restante
40,96	4,096	10	5	45	50	20,5	45
4,096	0,4096	10	5	45	50	2,05	45
0,4096	0,04096	10	5	45	50	0,2	45
0,04096	0,004096	10	5	45	50	0,02	45
0,004096	0,0004096	10	5	45	50	0,002	50

Aplicación de muestras a tarjeta FTA Elute:

- 5 Aplicar 5 μ l de las siguientes muestras sobre el área de muestra de la microtarjeta FTA Elute de Whatman; tampón de extracción 1x como control; virus diluido con tampón de extracción 1x; secar al aire la tarjeta FTA Elute durante 15 -20 min. a temperatura ambiente; punzonar un disco de 5 a 6 mm de diámetro con el punzón desde el área en que se aplicó la muestra para ponerla luego en un tubo de reacción MicroAmp de 0,2 ml; y

- 10 eluir el ARN del disco FTA Elute: añadir 150 μ l de agua al tubo que contenía el disco y agitar en vórtex 3x durante 5 segundos; eliminar agua utilizando una punta de pipeta estéril; repetir la adición/eliminación de agua una vez; centrifugar durante 5 segundos, entonces eliminar por pipeteado el líquido en exceso; añadir 50 μ l de agua, calentar a 65°C durante 30 min. entonces agitar en vórtex los tubos durante 5 segundos; y extraer 5 μ l del líquido y añadirlo al pocillo apropiado de la placa de RT de 96 pocillos.

- 15 Ensayo de RT-PCR

Programa de ciclador térmico para la etapa de RT

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
22	10	1
42	60	1
95	5	1
4	Espera	-

- 20 Transferir 10 μ l de la reacción de RT completada al pocillo de PCR apropiado que contenía la mezcla maestra de PCR. Añadir y retirar con pipeta para mezclar.

Tabla 28. Programa de ciclador térmico para la etapa de PCR

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
95	10 minutos	1
95	60 segundos	2
55	30 segundos	
72	45 segundos	
94	60 segundos	38
60	30 segundos	
72	30 segundos	
72	7 minutos	1
4	Espera	-

- 25

Evaluar las reacciones de PCR para el amplicón utilizando un bioanalizador de Agilent

Resultados de RT-PCR de Agilent: las reacciones sin control de molde no generaron ningún amplicón detectable.

- 30 Controles positivos de ARN

Tabla 29.

Copias/reacción	Influenza A			Influenza B		
	tamaño de banda	ng/ μ l	Pos/reacción	tamaño de banda	ng/ μ l	Pos/reacción
10K	233 pb	17,33	3/3	242 pb	18,28	2/2
1K	233 pb	11,57	5/5	245 pb	16,96	3/3
100	233 pb	3,84	3/3	246 pb	10,62	2/2
10 [1]	236 pb	0,30	3/3	246 pb	4,08	2/2

Los tamaños de las bandas observadas de controles positivos de ARN de virus de la gripe A y virus de la gripe B son del tamaño correcto.

5 Tabla 30. Virus influenza

Unidades de HA/disco	Influenza A			Influenza B		
	tamaño de banda	ng/μl	Pos/reacción	tamaño de banda	ng/μl	Pos/reacción
20	229 pb	17,39	2/2	246 pb	12,31	2/2
2	229 pb	5,83	2/2	247 pb	3,02	2/2
0,2	230 pb	2,34	2/2	247 pb	7,25	2/2
0,02	230 pb	0,34	1/2	247 pb	3,06	2/2
0,002	No detectado	No disponible	0/2	244 pb	1,08	2/2

10 Conclusión: ARN detectado de manera satisfactoria de virus de la gripe tipos A y B lisados utilizando la tarjeta FTA Elute de Whatman y amplificación mediante RT-PCR. El ensayo detectó hasta 0,2 unidades de HA/disco de virus de la gripe tipo A y 0,002 unidades de HA/disco de virus de la gripe tipo B. la tarjeta FTA Elute de Whatman puede utilizarse para archivar ARN viral para pruebas posteriores en un ensayo de RT-PCR para la detección de virus de la gripe tipos A y B.

15 Ejemplo 9. Detección multianálisis.

Para demostrar la prueba de principio de que la prueba de diagnóstico de virus de la gripe multianálisis puede diferenciar virus de la gripe H5N1 de gripe estacional, se desarrolló un ensayo rápido y de alta sensibilidad y se comparó con pruebas de flujo lateral tradicionales utilizando perla de látex coloreada u oro coloidal.

20 Se utilizó un marcador de lantánido en el que microperlas de látex rellenas con quelato de europio, combinadas con un tampón de lavado demostraron una sensibilidad mejorada. El virus de la gripe estacional (en este ejemplo, virus de la gripe tipo B) se diferenció claramente del virus de la gripe aviar H5N1 utilizando membrana sembrada en estrías directamente con anticuerpos antigripe A, antigripe B y anti-H5 en diferentes zonas en la tira de prueba.

25 Los datos demuestran que utilizando pARN y siembra en estrías directa de AcM sobre la nitrocelulosa como sistemas de captura en la misma tira de prueba de flujo lateral, puede detectarse por separado virus de la gripe A subtipo H1N1 y H5N1 así como nucleoproteína tipo B y tipo A en diferentes zonas de prueba en una única tira de prueba de nitrocelulosa. A continuación se muestra una tabla que resume las áreas del ensayo que se practicaron en este estudio.

30 Tabla 31. Tabla de prueba de concepto:

Componente de ensayo	Descripción
Membrana de nitrocelulosa bloqueada con caseína hidrolizada	Membrana Millipore 135, mismo material que la utilizada actualmente por Operaciones, el tamaño es diferente
Almohadilla de mecha tratada con Tween	Componente de operaciones convencionales
Almohadilla absorbente	Mismo material que el utilizado en operaciones, el tamaño es diferente
Tarjeta de refuerzo	Mismo material que el utilizado en operaciones, el tamaño es diferente
Tampón de extracción	Diseñado para lisar e inactivar virus de la gripe
Agente mucolítico	Diseñado para reducir la viscosidad de la mucosidad en el hisopo de muestra
Tampón de lavado	Formulación similar al tampón de extracción, diseñado para "lavar" las perlas de látex-Eu no unidas de la tira de prueba y reducir el fondo y "detener" el ensayo
AcM tipo A sembrado en estrías sobre nitrocelulosa directamente	Que muestra viabilidad para añadir directamente AcM en combinación con pARN
AcM tipo A conjugado con microperlas de látex-europio	Conjugar el AcM directamente con las microperlas de Eu
Par de AcM tipo B sembrado en estrías sobre nitrocelulosa directamente	Que muestra viabilidad para añadir directamente AcM en combinación con pARN
AcM tipo B conjugado con microperlas de Eu	Véanse los comentarios para el tipo A anteriormente
AcM contra H1N1 conjugado con un pARN específico	Que demuestra y muestra la prueba de concepto de que pueden utilizarse oligos de pARN como agente de captura genérico en el ensayo.

Componente de ensayo	Descripción
AcM contra H1N1 conjugado con biotina	Conjugar el AcM a biotina y hacer reaccionar el conjugado con perlas de Eu recubiertas con estreptavidina.
AcM contra H5N1 conjugado con un pARN específico	Que demuestra y muestra la prueba de concepto de que pueden utilizarse oligos de pARN como agente de captura genérico en el ensayo.
AcM contra H5N1 conjugado con Eu	Véanse los comentarios para el tipo A anteriormente
Microperlas de látex-europio recubiertas con estreptavidina y que se hacen reaccionar con H1N1	Se desarrolló un procedimiento para hacer reaccionar perlas de látex-europio recubiertas con estreptavidina con un AcM específico conjugado con biotina. Tras la reacción, se añade biotina libre en exceso para bloquear los sitios de reacción.
Microperlas de látex-europio recubiertas con estreptavidina y que se hacen reaccionar con AcM anti-H1	Véanse los comentarios anteriormente
Microperlas de látex-europio recubiertas con AcM individuales	Véanse los comentarios anteriormente
Lector	El lector presentará elementos ópticos más adecuados para la fuente de luz de LED UV y con filtros para eliminar la emisión de luz de fondo, para mejorar el rendimiento del sistema.
Reactivo de ensayo, disolución individual (mezcla de reactivo de extracción, agente mucolítico, trehalosa, agentes tamponantes, perlas de látex-europio con reactivos de detección conjugados/unidos y reactivos de captura con reactivos de detección y captura)	Esto permitirá confirmar el diseño con todos los reactivos de ensayos mezclados juntos.
Cuatro líneas de prueba de analito únicas más una línea control	El ensayo demostró cuatro líneas de prueba de analito que funcionan por separado

Materiales

- Se proporcionaron pARN activados previamente por el equipo de desarrollo de Nanogen Bothell.

- 102a10 (10 meros), n.º de lote 825-079^a
- 102b10 (10 meros, el pARN complementario de 102a10), n.º de lote 825-065D, n.º de lote 825-065D
- 3a10 (10 meros), n.º de lote 825-079C
- 3b10 (10 meros, el pARN complementario de 3a10), n.º de lote 825-065F, n.º de lote 825-065F

- Anticuerpo

- 7304 antigripe A de BiosPacific
- M4090913 antigripe A de Fitzgerald
- 2/3 antigripe B de HyTest
- M2110171 antigripe B de Fitzgerald
- M322210 anti-virus influenza H1 de Fitzgerald
- 8252K anti-virus influenza H1 de Chemicon
- 10F7 anti-virus influenza H5 de la Universidad de Xiamen
- 3G4 anti-virus influenza H5 de la Universidad de Xiamen

- Micropartículas modificadas con carboxilato OptiLink (perlas de europio)

Se adquirieron perlas de europio con 0,3 M de diámetro de ThermoFisher Scientific (Seradyn). n.º de cat. 83470750010250, n.º de lote de fabricación C020512, n.º de lote de envase 201154.

- Virus

Virus influenza B Hong Kong/5/72 de Microbix, B/Shanghai/2002 del laboratorio del Dr. Bovian, A/Taiwan/1/86 (H1N1) de NIBSC, A/Beijing/95(H1N1) proporcionado por el laboratorio del Dr. Bovian, Bar-headed GS/QH/15/2005 (H5N1) y DK/VNM/ 568/2005 (H5N1) del laboratorio del Dr. Guan en la Universidad de Hong Kong.

- Tampón de extracción tres (3) x que contenía Tris-Cl 150 mM, pH 8,0, NaCl 2,25 M, BSA al 3%, caseína digerida al 1,5%, Pluronic F68 al 0,3% y ProClin 300 al 0,15%, n.º de lote 2277-038.

- Disolución: disolución de clorhidrato de tris(2-carboxietilfosfina) 0,2 M, n.º de lote 2277-067.

7. Estreptavidina recombinante.

8. Anticuerpo 5G4 no específico para la conjugación con pARN, preparado por la instalación de Nanogen en Toronto y utilizado para sembrar en estrías sobre la nitrocelulosa.

9. Tarjeta de refuerzo de tiras, 0,1" de poliestireno superblanco de G&L

10. Almohadilla absorbente, papel de filtro de grado 222 de Alstrom filtration

11. Almohadilla de mecha, almohadilla de poliéster tratada con Tween 20 al 0,05%.

Procedimiento

Preparación de conjugado de anticuerpo-europio

1.1 Se conjugaron los anticuerpos M4090913, 2/3 y 3G4 con perlas de europio 0,3 M por ThermoFisher Scientific (Seradyn).

1.2 Se preparó conjugado de anticuerpo 8252k-europio a través de un procedimiento indirecto combinando 8252K biotinilado con micropartículas de europio recubiertas con estreptavidina. Se prepararon 8252K biotinilado y micropelotas de europio recubiertas con estreptavidina en la instalación de Nanogen en Toronto. Se sonicó la disolución madre de estreptavidina-europio al 1% de sólidos con un sonicador de baño durante 5 min. Se diluyó entonces hasta el 0,02% con conjugado de tampón de dilución de europio y se sonicó con un sonicador de sonda durante 20 s. Se diluyó 8252K biotinilado hasta 10 µg/ml con tampón PBS. Se añadió una alícuota de 5 µl a cada tubo. Entonces se mezcló rápidamente una alícuota de 5 µl de conjugado de estreptavidina-europio del 0,02% de sólidos con 8252K biotinilado. Se bloqueó el conjugado utilizando 2,5 ul de biotina 100 mM. Entonces se utilizó directamente el conjugado de 8252k-europio en el ensayo.

2. Preparación de conjugado de anticuerpo-pARN: se concentraron todos los anticuerpos hasta aproximadamente 20 mg/ml utilizando Microcon 50 de Amicon. Se cambió el tampón a borato de sodio 0,1 M, pH 9,0. Se añadió una alícuota de 1 mg de anticuerpo 5G4 no específico a tubos que contenían 33,5 nmol de pARN 102b10 o 3b10 activado previamente (polvo seco). Se añadieron una alícuota de 0,5 mg de M322210 y 0,5 mg de 10F7 a tubos que contenían 16,7 nmol de pARN 102a10 y 3a10 activados previamente, respectivamente. Se llevó a cabo la reacción durante 15 horas a temperatura ambiente. Se purificó el conjugado de anticuerpo-pARN con una columna Sephadex G-50 equilibrada con tampón PBS 10 mM, pH 7,0. Se resolvieron dos picos, el primer pico con conjugado y el segundo pico con pARN no activado (confirmado mediante HPLC, datos no mostrados)

3. Preparación de membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con cuatro líneas de prueba. Para esta membrana, se sembraron en estrías directamente los anticuerpos 7304 antigripe A y M2110171 antigripe B a 1,5 mg/ml para la línea de prueba "A" y la línea de prueba "B", respectivamente. Se sembraron en estrías los conjugados 102b10-5G4 y 3b10-5G4, ambos a 0,75 mg/ml, para las líneas de prueba "H1" y "H5". Se sembró en estrías la línea de control con anticuerpo de conejo antirratón 0,5 mg/ml. Todas las líneas estaban separadas 5 mm. Entonces se bloqueó la membrana con una disolución que contenía PVP al 0,35%, Triton X-100 al 0,25% y caseína digerida al 0,5%, y se curó a 37°C.

4. Preparación de tira de prueba: se laminó membrana de nitrocelulosa sembrada en estrías con 4 líneas de prueba y una línea control sobre la tarjeta de refuerzo y presenta 1-2 mm de solapamiento con la almohadilla de poliéster tratada y la almohadilla absorbente. Se cortaron tiras de 5 mm de anchura utilizando un cortador de tiras Kinematic 2360.

5. Procedimiento de prueba. Se preparó mezcla de ensayo de la siguiente manera. A un tubo de prueba, se le añaden 16,7 µl de tampón de extracción 3x, 0,5 µl de TCEP 0,2 M, 0,1 µg de conjugado 102a10-M322210, 0,1 µg de conjugado 3a10-10F7, conjugado de anticuerpo-europio y diferentes virus. La concentración final de todos los conjugados de anticuerpo-europio es del 0,002% de sólidos en un volumen final de 50 µl. Se inició la prueba insertando la tira de prueba en la mezcla de ensayo. Tras 15 min., se añadieron otros 50 µl de tampón de extracción 1x para lavar la tira. Se leyeron las tiras con un lector de fluorescencia a los 20 min.

Resultados.

Tabla 32. La siguiente tabla compara la razón señal/ruido de diferentes picos de prueba cuando se someten a prueba con diferentes virus.

Virus	Descripción	Señal/ruido de cada línea de prueba			
		H5	H1	B	A
H5	Bar Headed GS/QH/15/2005	116,9	2,0	0,6	245,7
	DK/VNM/568/2005	122,0	5,7	1,0	606,9
H1	Taiwan/1/86	8,5	63,8	0,4	492,7
	Beijing/95	6,4	44,4	0,5	896,5
Gripe B	Hong Kong 5/72	3,5	1,3	437,1	4,8
	Shanghai/2002	2,0	1,2	376,0	3,9

Los datos muestran claramente que el sistema de prueba puede diferenciar múltiples analitos. En este ejemplo, los analitos detectados incluían virus de la gripe subtipo H1N1 estacional, gripe B de gripe aviar H5N1 con una buena señal de tipo A. En esta prueba, se utilizaron dos pares de pARN como el sistema de captura para diferenciar la línea de prueba H1 de la línea de prueba H5. Se observó cierta baja reactividad en la posición de la línea de prueba H1 cuando se sometieron a prueba virus H5, lo que indica una pequeña cantidad de hibridación de pARN 3a10 conjugado en anticuerpo anti-H5 con 102b10 sembrado en estrías en la línea de prueba H1. No se observaron efectos de reacción de falso positivo en la línea de prueba específica de H5 cuando se sometieron a prueba virus de subtipo H1N1.

Además, este informe muestra claramente que el ensayo muestra buena reactividad, buena separación de señales de analito cuando se utiliza una única mezcla de reacción multianalito para todas las muestras de prueba. Además, el ensayo puede detectar todos los analitos apropiados cuando se somete a prueba una única muestra de prueba a cargas virales moderadas simultáneamente.

Conclusión: los resultados demuestran que con virus de múltiples subtipos y cepas, se logra una separación significativa de las señales para cada analito para cada cepa o subtipo viral sometido a prueba (figuras 36 a 38). Para garantizar que los resultados presentaban validez, se sometieron a prueba dos cepas separadas de cada subtipo. Además, los resultados demuestran claramente que se aplica un sistema de captura genérico de pARN a los sistemas de detección de H1 y H5, permitiendo por tanto la utilización del sistema de captura de pARN paneles adicionales de diferentes analitos.

Además, el ensayo puede adaptarse fácilmente para incorporar agentes de unión específicos del analito adicionales. Además, pueden utilizarse dispositivo/ensayos de la invención en procedimientos de examen de diferentes analitos. Por ejemplo, puede examinarse un gran número de clones que expresan anticuerpo anti-H3 para determinarlos.

Naturalmente, los dispositivos/procedimientos de la invención pueden utilizarse para examinar nuevas cepas virales (un ejemplo importante es la nueva cepa de tipo Fujan). Por ejemplo, a medida que se obtienen nuevos AcM para nuevas cepas del subtipo H5N1, pueden incorporarse en el dispositivo de prueba y SCD de la invención para su examen.

Los resultados mostrados anteriormente han demostrado claramente que se ha descubierto una nueva tecnología de ensayo que es altamente sensible y puede detectar independientemente diferentes tipos y subtipos virales en la misma tira de prueba. Además, puede administrarse tal ensayo en un entorno de punto de atención.

Ejemplo 10. Detección multianalito: proteínas marcadoras

El dispositivo y los procedimientos de la invención también pueden utilizarse para detectar diversos analitos asociados con un estado patológico o estado nutricional, o cualquier otra característica asociativa. Por ejemplo, pueden detectarse y/o cuantificarse múltiples marcadores cardíacos:

- (1) El marcador de troponina: el anticuerpo de captura es un anticuerpo policlonal de conejo anti-troponina-I y conjugado con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 98). El anticuerpo de detección es una mezcla de dos AcM de ratón y conjugados con biotina y que se hacen reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina.
- (2) El marcador de CK/MB. El anticuerpo de captura es un anticuerpo policlonal de cabra y se conjuga con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 99). El anticuerpo de detección es también un AcM y se conjuga con biotina y se hace reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina.
- (3) El marcador de mioglobina: el anticuerpo de captura es un anticuerpo policlonal de conejo anti-mioglobina y se conjuga con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 100). El anticuerpo de detección es también un AcM y se conjuga con biotina y se hace reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina.

(4) Línea control compuesta por anticuerpo de conejo anti-ratón.

Por tanto, el sistema de ensayo de "punto de atención" multianalito puede cuantificar cada uno de los marcadores individualmente en un único formato de ensayo tal como se expuso anteriormente y tal como sigue:

Utilizando el lector con un patrón de europio duro (un patrón de europio bloqueado en material acrílico y produce una lectura uniforme en un conjunto uniforme de condiciones a lo largo de un periodo de tiempo prolongado) que garantiza que el lector puede cumplir los requisitos de intensidad de señal de fluorescencia de manera reproducible. Por tanto, puede cuantificarse cada analito independientemente

Ejemplo 11- Detección multianalito: virus

Tal como se dio a conocer anteriormente en la presente memoria, los dispositivos de la invención también pueden configurarse para detectar múltiples virus diferentes, o diferentes subtipos de un virus. Por ejemplo, los dispositivos de la invención pueden configurarse para proporcionar un ensayo cualitativo de virus de la gripe multianalito más VRS en el que pueden detectarse múltiples analitos de una única muestra:

(1) Virus influenza tipo A: el anticuerpo de captura es un AcM y se conjuga con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 99); El anticuerpo de detección es también un AcM y se conjuga con biotina y se hace reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina

(2) Virus influenza tipo B: el anticuerpo de captura es un AcM monoclonal de ratón y se conjuga con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 100); el anticuerpo de detección es también un AcM y se conjuga con biotina y se hace reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina.

(3) Virus influenza H1 y H3: los anticuerpos de captura son AcM específicos para hemaglutinina H1 y H3 y se conjugan todos con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 101); el anticuerpo de detección es también un AcM y se conjuga con biotina y se hace reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina.

(4) Virus influenza H5: el anticuerpo de captura es un AcM monoclonal de ratón y se conjuga con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 102); el anticuerpo de detección es también un AcM y se conjuga con biotina y se hace reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina.

(5) VRS: el anticuerpo de captura es un AcM monoclonal de ratón y se conjuga con una secuencia de pARN específica (SEC ID n°: 103); el anticuerpo de detección es también un AcM y se conjuga con biotina y se hace reaccionar con micropartículas de látex-europio de 0,3 u recubiertas con estreptavidina.

(6) Línea control: el anticuerpo de captura es anticuerpo de conejo antirratón y se une al AcM en la micropartícula de europio-látex.

Ejemplo 12. Expresión de anticuerpos de cadena sencilla de 10F7 y 4D1 y prueba de sus actividades.

Se ligaron los genes de región variable de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo con un ácido nucleico que codifica para un péptido corto (GGGGS) para formar el fragmento de ADN que codifica para un anticuerpo de cadena sencilla. Se utilizan 10F7 VHF/10F7 VHR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de ADN de región variable de la cadena pesada de 10F7. Utilizar 10F7 VKF/10F7 VKR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de ADN de región variable de la cadena ligera de 10F7. Utilizar 4D1 VHF/4D1 VHR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de ADN de región variable de la cadena pesada de 4D1. Utilizar 4D1 VKF/4D1 VKR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de ADN de región variable de la cadena ligera de 4D1.

Se utilizan 10F7 VHF/10F7 VKR como cebadores para amplificar el fragmento de ADN de cadena sencilla de 10F7 solapante. Se utilizan 4D1 VHF/4D1 VKR como cebadores para amplificar el fragmento de ADN de cadena pesada de 4D1 solapante. Se recuperaron los fragmentos de ADN amplificados, se digirieron con BamH I y Sal I, y se clonaron en el vector de expresión procariota pTO-T7 digerido con las mismas enzimas de restricción. Utilizando ER2566 *E. coli* como células huésped, se expresaron proteínas de anticuerpo de cadena sencilla utilizando procedimientos convencionales. Las proteínas expresadas estaban en forma de cuerpos de inclusión insolubles. Se rompieron los cuerpos de inclusión mediante tratamiento con ultrasonidos, y se purificaron los sedimentos resultantes utilizando procedimientos convencionales. Se disolvieron los sedimentos purificados en urea 8 M. Se dializó la disolución de urea lentamente en disolución de PBS 1x, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. para retirar los sedimentos restantes. Se sometió a prueba la disolución de anticuerpo de cadena sencilla purificado final para determinar sus actividades.

Se seleccionan 26 cepas de virus H5N1 para someter a prueba las actividades de los anticuerpos de cadena sencilla 10F7 y 4D1 purificados anteriormente utilizando el ensayo de HI tal como se describió anteriormente. Se utiliza la

concentración de anticuerpo de cadena sencilla 10F7 a 1,06 mg/ml. Se utiliza la concentración de anticuerpo de cadena sencilla 4D1 a 0,34 mg/ml. El anticuerpo de cadena sencilla 4D1 presenta una actividad de inhibición de HA frente a 23 de las cepas de virus. El anticuerpo de cadena sencilla 10F7 muestra actividad de inhibición de HA frente a 14 de las cepas de virus (tabla 33 a continuación).

5 Tabla 33. Actividades de inhibición de HA inhibición de los tres anticuerpos de cadena sencilla frente a los 25 virus H5N1.

Cepas de virus H5N1	ScFv		
	4D1	10F7	8H5
A1	>8	>8	3,5
A2	>8	>8	4,5
A3	>8	>8	3,5
A5	>8	>8	4
A6	7	7,5	3
A7	6	6,5	3
A8	>8	6	2,5
B1	>8	7	4
B2	0	0	0
B3	>8	>8	5
B4	>8	>8	5
B5	0	0	0
B6	>8	7	3,5
B7	>8	7	4
B8	>8	7	3
C2	>8	2	1
C3	>8	1	0
D1	>8	2,5	2,5
D2	7,5	2,5	2
E1	1	0	0
E2	1	0	0
F2	5	0	0
F3	3	0	0
G1	3,5	0	0
H1	6	<1	0
H2	4	0	0

10 Se diluye en título de HI a la potencia de orden "n" de 2. "n" son los números mostrados en la tabla.

Se sometió a prueba la actividad del anticuerpo de cadena sencilla 10F7 purificado anteriormente utilizando el procedimiento de neutralización. Se utilizaron 7 cepas de virus que se aislaron de gallina, pato y diversas aves silvestres en Hong Kong, Indonesia, Qinghai y otras áreas durante el periodo de 2002 a 2006, para someter a prueba la actividad de 10F7 utilizando el ensayo de HI. El anticuerpo mostró buena actividad de neutralización frente a 5 de las cepas de virus (tabla 34). A 64 veces de dilución, el anticuerpo todavía podría inhibir la infección por el virus de células huésped.

20 Tabla 34. Resultados de la prueba de neutralización del anticuerpo de cadena sencilla 10F7

Cepa de virus	Dilución de scFv de 10F7
CK/HK/Yu22/02	64
DK/IDN/MS/04	16
CK/IDN/2A/04	32
BhGs/QH/5/05	16
CK/HK/213/03	< 1
CP Heron/HK/18/05	8
Oriental Magpie Robin/HK/366/2006	< 1

Ejemplo 13. Detección actividades de péptidos de 7 aa

25 Se amplificaron los tres bacteriófagos que contenían los péptidos de 7 aa de 8H5A, 8H5E y 3C8A en grandes números. Se disolvieron en PBS tras precipitarse con PEG. El título de fago estaba entre 10^{11} y 10^{12} . Se recubrieron previamente microplacas con los anticuerpos monoclonales 8H5, 4A1, 9N7 y 4D11 a 5 µg/ml. Se bloquearon las placas con PBS que contenía leche al 5%. Se diluyeron en serie los tres bacteriófagos; y se añadieron a las placas. Se siguió con la reacción durante 1 h. Entonces se lavaron las placas durante 5 veces. Se añadió anticuerpo de ratón anti-M13/HRP diluido 1:5.000 (Amersham Pharmacia Biotech, R.U.) como anticuerpo secundario y se incubó

durante 0,5 h. Se leyeron los resultados tras completarse la reacción. Se muestran los resultados en la tabla 35 a continuación, que demostraron que las reacciones específicas entre el péptido 8H5A y el anticuerpo monoclonal 8H5 eran buenas y las reacciones específicas entre 8H5A y los otros tres anticuerpos monoclonales eran débiles. La reacción específica entre 8H5E y el anticuerpo monoclonal 8H5 era relativamente escasa.

Tabla 35. Resultados de detección de la actividad de unión específica de péptidos de 7 aa a anticuerpos monoclonales

Anticuerpo monoclonal	8H5A (1:1000)	8H5E (1:1000)
8H5	0,559	0,25
4A	0,158	0,142
9N7	0,062	0,065
4D11	0,118	0,078

Ejemplo 14. Sistema de captura de ACM frente a sistema de captura de pARN utilizando la prueba de virus de la gripe A de Nanogen

Para comparar la sensibilidad de la prueba de virus de la gripe A de Nanogen utilizando 2 sistemas de captura diferentes y para comparar el sistema de captura de pARN utilizando 2 tiras de prueba diferentes

Procedimiento para cortar las tiras de prueba: preparar la tarjeta de membrana colocando la almohadilla absorbente (3,5 cm de ancho) y pretratarse con Tween-20; cortar previamente la almohadilla de mecha de poliéster (1,4 cm de ancho) en el lado adhesivo con 1 mm de solapamiento con la membrana, sembrada en estrías con anticuerpo apropiado. Cortar esta tarjeta preparada en tiras de prueba de 5 mm de ancho con un cortador de papel

Dilución de virus: diluir 40960 unidades de HA/ml de virus de la gripe A/Texas/1/77 con BSA al 1% en PBS según el siguiente esquema de dilución.

Tabla 36: Esquema de dilución para virus de la gripe A

Conc. inicial (unidades de HA/ml)	factor de dilución	Vol. inicial (μ l)	BSA al 1% en vol. de PBS (μ l)	Vol. final (μ l)	Conc. final (unidades de HA/ml)
40960	1:100	1	99	100	409,6
409,6	1:10	50	450	500	40,96
40,96	1:10	20	180	200	4,096

Dilución de europio: Diluir conjugado de 17-10-06-1-europio hasta el 0,02% utilizando el tampón de dilución de europio; 245 μ l de tampón de dilución de europio + 5 μ l de disolución madre al 1%. Sonicar el conjugado de europio diluido utilizando un sonicador de sonda (modelo 550 de Fischer) al ajuste de potencia de 3, tiempo total de 20 segundos (10 s de tiempo encendido y 5 s de tiempo apagado).

Dilución de conjugado de pARN: Diluir conjugado 102a10-7304 (0,39 mg/ml) hasta 0,1 mg/ml con PBS 10 mM, pH 7,2; 37,2 μ l de PBS + 12,8 μ l de conjugado 102a10-7304.

Procedimiento de ensayo: preparar las mezclas de ensayo según las siguientes tablas

Tabla 37: Mezcla de ensayo para el sistema de captura de ACM

Unidades de HA/prueba	4,096 unidades de HA/ml				40,96 unidades de HA/ml	
	0	0,01	0,02	0,04	0,1	1
Tampón de extracción 3x (μ l)	41,75	41,75	41,75	41,75	41,75	41,75
TCEP 0,2 M (μ l)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
conj. de europio al 0,02% (μ l)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Virus de la gripe A (μ l)	0	6,25	12,5	25	6,25	62,5
agua (μ l)	69,5	63,25	57	44,5	63,25	7
Vol. total para 2,5 pruebas (μ l)	125	125	125	125	125	125

Tabla 38: Mezcla de ensayo para el sistema de captura de pARN

Unidades de HA/prueba	4,096 unidades de HA/ml				40,96 unidades de HA/ml	
	0	0,01	0,02	0,04	0,1	1
Tampón de extracción 3x (μ l)	83,5	83,5	83,5	83,5	83,5	83,5
TCEP 0,2 M (μ l)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

conj. de europio al 0,02% (μl)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Virus de la gripe A (μl)	0,0	12,5	25,0	50,0	12,5	125,0
Conj. 102a10-7304 0,1 mg/ml (μl)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
agua (μl)	134,0	121,5	109,0	84,0	121,5	9,0
Vol. total para 5 pruebas (μl)	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0

Tabla 39. Materiales

Material	Lote	Nota
1 Almohadilla absorbente: grado 222, 12 pulgadas x 12 pulgadas	6150502	n. de cat. 2228-1212
2 Almohadilla de mecha: almohadilla de poliéster pretratada con Tween 20	06PPP0157C	Grado 6613
3 Membrana con 7304 de Medix antigripe A (1,5 mg/ml)	310806	
4 Membrana sembrada en estrías con 102b10-5G4	131206-2-1	conc. de 0,75 mg/ml, sin bloqueo
5 Membrana sembrada en estrías con 102b10-5G4	131206-2-2	conc. de 0,75 mg/ml bloqueada con caseína al 0,5% (Toronto)
6 Tampón de extracción 3x	2271-001	DOM 15/11/06
7 Tampón de extracción 1x	2232-003	DOM 15/11/06
8 TCEP 0,2 M	2232-180	DOM 9/11/06
9 Agua para biología molecular	1347929	N.º de cat. 10977-015, GIBCO
10 BSA al 1% en solución salina tamponada con fosfato 0,10 M	2271-036	DOM 14/12/06
11 Virus de la gripe A/Texas/1/77 a 40960 unidades de HA/ml	13037A3	N.º de cat. EL-13-02
12 Tampón de dilución de europio	N/D	DOM 8/6/06 por Roy Chung
13 Conjugado de europio con M4090913	17-10-06-1	Preparado por Philip Lam
14 Conjugado de pARN 102a10-7304	2271-028-2	DOM 8/12/06, conc. de 0,39 mg/ml
15 PBS 10 mM pH 7,2	2271-035	DOM 14/12/06

- 5 Incubar tiras de prueba de 7304 (1,5 mg/ml) con la mezcla de ensayo del sistema de captura de ACM.

Incubar tiras de prueba de 102b10-5G4 (0,75 mg/ml) sin bloqueo, y bloqueadas con caseína al 0,5% con la mezcla de ensayo del sistema de captura de pARN.

- 10 Ejecutar el experimento por duplicado.

Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 min.

Añadir 50 μl de tampón de extracción 1x al mismo tubo para lavar las tiras de prueba.

- 15 Tras 5 min., leer las tiras de prueba utilizando un lector de fluorescencia.

Resultados

- 20 Tabla 40. Sistema de captura de ACM (véase la figura 39)

Unidades de HA/prueba	0	0,01	0,02	0,04	0,1	1
1	528,1	793,7	935,7	1421,6	2550,1	21111,3
2	569,6	776,0	1037,5	1440,0	2395,4	19961,8
Prom.	548,8	784,9	986,6	1430,8	2472,8	20536,5
S/N		1,4	1,8	2,6	4,5	37,4

Tabla 41. Sistema de captura de pARN con membrana 0,75 mg/ml bloqueada con caseína al 0,5% (véase la figura 40)

Unidades de HA/prueba	0	0,01	0,02	0,04	0,1	1
1	114,6	434,1	70,30	1360,9	3227,1	21209,1
2	222,6	628,5	80,46	1385,1	2891,4	19440,1
Prom.	168,6	531,3	753,8	1373,0	3057,1	20324,6
S/N		3,2	4,5	8,1	18,1	102,5

Tabla 42. Sistema de captura de pARN con membrana 0,75 mg/ml sin bloqueo (véase la figura 41)

Unidades de HA/prueba	0	0,01	0,02	0,04	0,1	1
1	284,4	737,9	940,0	1880,4	3336,0	22387,5
2	318,1	612,2	814,6	1471,3	3560,8	22383,6
Prom.	301,3	675,1	877,3	1675,9	3448,4	22385,6
S/N		2,2	2,9	5,6	11,4	74,3

Conclusión: tal como indican los datos, la mayor sensibilidad de la prueba es con el sistema de captura de pARN cuando se utiliza con tiras de prueba bloqueadas con caseína al 0,5% de Toronto con una razón señal/ruido de 120 con 1 unidad de HA pero utilizando adición directa de AcM sobre la tira de prueba, la razón S/N fue de sólo 37,4 indicando que el sistema de captura de pARN mejoró significativamente la sensibilidad del sistema de ensayo.

SEC ID n°: 1 Secuencia de nucleótidos de 8H5 Vh

```
cagggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaage ctggggcctc agtgaagata
tcctgcaagg ctactggcta cactttcagt aactactgga tagagtggat aaagcagagg

cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagcgatag aacaaactac
aatgggaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catectccaa cacagcccac
atgcaactca gtagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aaatagatac
gacgggtatt attttggttt ggattactgg ggtcaaggaa cctcagtcgc cgtctcctca
gcc
```

SEC ID n°: 2

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
20          25          30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50          55          60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala His
65          70          75          80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Asn Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100         105         110

Gly Thr Ser Val Ala Val Ser Ser Ala
```

SEC ID n°: 3 Secuencia de nucleótidos de 8H5 Vk

gaaatcgtgc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga gaaggtcacc
atgagctgca gggccagctc aagtgtaaat ttcgtttact ggtaccagca gaggtcagat
gcctccccc aactattgat ttactattca tccaacctgg ctctgggagt cccacctcgc
ttcagtggca gtgggtctgg gaactcttat tctctcaca tcagcggctt ggaggggtgaa
gatgctgcc cttattactg ccagcacttt actagttccc cgtacacggt cggagggggg
accaacctgg aaataaaacg g

SEC ID n°: 4 Secuencia de aminoácidos de 8H5 Vk

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Phe Val
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Asp Ala Ser Pro Lys Leu Ile Tyr
35 40 45
5 Tyr Ser Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Gly Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Thr Ser Ser Pro Tyr Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

SEC ID n°: 5 Secuencia de nucleótidos de 3C8 Vh

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc
tcctgcaagg cctctgggta cagcttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct
ccaggaaagg gtctaaagtg gatgggctgg ataaacacct acaccggaga gccagcctat
gctgatgact tcaagggacg gtttgcttc tctctggaaa cctctgccag cactgcctat
ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc aagatggaat
10 agagatgcta tggactactg ggggtcaagga acctcggtca ccgtatctag c

SEC ID n°: 6 Secuencia de aminoácidos de 3C8 Vh

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ala Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Asn Arg Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

SEC ID n°: 7 Secuencia de nucleótidos de 3C8 VK

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctcttgggca gagggccacc
atatactgca gagccagtga aagtgttgat agttctgaca atagtcttat gcactggtac
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat
cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtattgg ggatcctccg
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg

5

SEC ID n°: 8 Secuencia de aminoácidos de 3C8 Vh

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Ser	Ser
			20					25					30		
Asp	Asn	Ser	Leu	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
	35						40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn
65					70				75						80
Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Ile
				85					90					95	
Gly	Asp	Pro	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

10

SEC ID n°: 9 Secuencia de nucleótidos de 10F7 Vh

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagctg
tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg
cctggacagg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgattotta tactaactac
aatcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggggggt
acaggagact ttcactatgc tatggactac tgggggtcaag gcacctcgggt caccgtatca
tcg

15

SEC ID n°: 10 Secuencia de aminoácidos de 10F7 Vh

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
		20					25						30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
	35						40					45			
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75						80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Thr	Gly	Asp	Phe	His	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
		100						105						110	
Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

SEC ID n°: 11 - Secuencia de nucleótidos de 10F7 VK

gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc
atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag ggtgggttgca gcagaaacca
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggaagatgg agttccatca
5 aggttcagtg gcagtggtac tggagcagat tattctctca ccacagcag cctggaatct
gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgttcagt tcccgtacac gttcggaggg
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg

SEC ID n°: 12 Secuencia de aminoácidos de 10F7 VK

Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Ser	Val	Ser	Leu	Gly
1			5						10					15	
Asp	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Asn
		20						25					30		
Ile	Gly	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Gly	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	His	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Tyr	Val	Gln	Phe	Pro	Tyr
			85					90						95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
		100					105								

SEC ID n°: 13. Secuencia artificial/organismo desconocido

catgggatgc tgccggtgta t

SEC ID n°: 14. Secuencia artificial/organismo desconocido

aattctgggc ctggctgac g

SEC ID n°: 15. Secuencia artificial/organismo desconocido

tggccgctc tgcgaagaa g

SEC ID n°: 16, Secuencia de nucleótidos de 4D1 VH

5 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaacctg
tcctgtaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg
cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagttt tactacctac
aatcaaaaact tcaaagacag ggccacattg actgtagaca aatcatccag cacagcctac
atgcagctca gaagtctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc caggggggggt
ccaggagact ttcgctatgc tatggattac tggggccaag gcacctcggg caccgtctcc
tca

SEC ID n°: 17 - Secuencia de aminoácidos de 4D1 VH

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
10 Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Pro Gly Asp Phe Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

SEC ID n°: 18 - Secuencia de nucleótidos de 4D1 VK

gacatcctga tgacceaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc
atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag ggtgggttgca gcagaaacca
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggaagatgg agttccatca
aggttcagtg gcagtggatc tggagcagat tattctctca ccatcagcag cctggaatcc
gaagactttg cagactatta ctgtgtacag tatgttcagt ttcctacac gttcggaggg
15 gggaccaagc tggaaataaa acgggct

SEC ID n°: 19 - Secuencia de aminoácidos de 4D1 VK

Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Ser	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Ile	Gly	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Gly	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	His	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Tyr	Val	Gln	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala			
			100					105							

SEC ID n°: 20 - Secuencia de nucleótidos de 3G4 VH

cagggtccaac tgcagcagtc tggggctgag ctgggtgaggc ctgggggtctc agtgaagatt
tcttgcaagg gttctggcta cacattcact gatttatgcta tgcattgggt gaagcagagt
catgcaaaga gtctagagtg gattggactt attaatactg actatgggtga tactacttac
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccaa cacagcctat
atggaacttg ccagactgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagatcggac
tatgattact atttctgtgg tatggactac tggggctcaag gaaccacggt caccgaatct

5 cta

SEC ID n°: 21 - Secuencia de aminoácidos de 3G4 VH

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Val
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Ala	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Leu	Ile	Asn	Thr	Asp	Tyr	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ala	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Leu							
			115					120							

10

SEC ID n°: 24 - Secuencia de nucleótidos de 2F2 VH

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctgggtggcgc cctcacagcg cctgtccatc
acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc ggctatgggtg tacactggat tcgccagtct
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggctg agggagaagc cgactataat
tcagttctca aatccagact gagcatcaat aaggacaatt ccaggagcca agttttctta
gaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccagggtact actgtgccag agaggtgatt
actacggaag cctgggtactt cgatgtctgg ggccaaggaa cctcgggtcac cgaatct

15

SEC ID n°: 25 - Secuencia de aminoácidos de 2F2 VH

```

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1      5      10      15
Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20      25      30
Gly Val His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35      40      45
Gly Met Ile Trp Ala Glu Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ser Val Leu Lys
50      55      60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu
65      70      75      80
Glu Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85      90      95
Arg Glu Val Ile Thr Thr Glu Ala Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100     105     110
Gly Thr Ser Val Thr Glu Ser
115

```

5 SEC ID n°: 26 - Secuencia de nucleótidos de 2F2 VK

```

gacattgtga tgactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct
ctttcctgca gggccagcca gagtattagc gactacttat actggtatca acaaaaatca
catgagtctc caaggettct catcaaatat gcttcccaat ccatctctgg gatccctcc
agattcagtg gcagtggtac agggtcagat ttcactctca ctatcaacag tgtggaacct
gaagatgttg gaatgtatta ctgtcaaaat ggtcacacct ttccggtcac gttcgggtgt
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg

```

SEC ID n°: 27 - Secuencia de aminoácidos de 2F2 VK

10

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20      25      30
Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35      40      45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Pro
65      70      75      80
Glu Asp Val Gly Met Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Thr Phe Pro Leu
85      90      95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg.

```

REIVINDICACIONES

1. Sistema para detectar una pluralidad de analitos que comprende:

- 5 (a) un dispositivo de prueba de flujo lateral que comprende una tira absorbente y una cámara aguas arriba que contiene un tampón de lavado liberable, comprendiendo la tira absorbente:
 - (i) una zona de aplicación de muestra,
 - 10 (ii) una zona de detección que comprende una o más bandas oligonucleotídicas discretas unidas de manera no difusiva a dicha tira, y
 - (iii) una zona de control; y
- 15 (b) un dispositivo de recogida de muestras independiente de dicho dispositivo de prueba adecuado para la extracción de analito de una muestra, y configurado para interconectarse con una abertura del dispositivo de prueba de flujo lateral para el suministro de muestra líquida a la zona de aplicación de muestra, comprendiendo el dispositivo de recogida de muestras: un reactivo de extracción en un volumen de desde 50 hasta 100 µl, unos reactivos para un inmunoensayo en una forma secada sólida para la extracción con la muestra, comprendiendo los reactivos un primer conjugado y un segundo conjugado para cada uno de dichos analitos:
 - (i) comprendiendo cada dicho primer conjugado una pareja de unión específica para su analito, y un oligonucleótido que presenta una secuencia complementaria a un oligonucleótido de una de dichas bandas discretas; y
 - 25 (ii) comprendiendo cada dicho segundo conjugado una pareja de unión específica para su analito, y un marcador.
- 30 2. Sistema según la reivindicación 1, en el que los oligonucleótidos son pARN, presentando el pARN de cada banda discreta una secuencia diferente.
3. Sistema según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de prueba comprende además un mecanismo para liberar el tampón de lavado puncionando, presionando o rompiendo un compartimento para el tampón de lavado.
- 35 4. Sistema según la reivindicación 3, en el que el compartimento comprende una ampolla o membrana blanda.
5. Sistema según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de recogida de muestras comprende los primer y segundo conjugados en una primera cámara sellada, y comprende además un tampón de extracción de muestra en una segunda cámara, en el que el tampón de extracción puede liberarse de modo que se permite la comunicación fluidica entre la primera cámara y la segunda cámara.
- 40 6. Sistema según la reivindicación 1, en el que los primer y segundo conjugados están en forma de un gránulo.
- 45 7. Sistema según la reivindicación 1, en el que las parejas de unión específica se seleccionan independientemente de anticuerpos monoclonales y policlonales.
8. Sistema según la reivindicación 1, en el que la zona de control comprende un elemento de unión específica inmovilizado para un reactivo de control marcado, estando alojado el reactivo de control marcado en dicho dispositivo de recogida de muestras.
- 50 9. Sistema según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de prueba comprende una abertura u orificio para recibir el dispositivo de recogida de muestras para la aplicación de la muestra.
- 55 10. Sistema según la reivindicación 1, en el que el marcador es un marcador particulado seleccionado de entre oro coloidal, una partícula teñida o coloreada o un marcador particulado que comprende un metal lantánido.
11. Sistema según la reivindicación 10, en el que el marcador es una partícula de quelato de europio (III) fluorescente.
- 60 12. Sistema según la reivindicación 1, en el que el sistema comprende además un lector de fluorescencia.
13. Sistema según la reivindicación 12, en el que el lector de fluorescencia comprende una lámpara que emite UV A y/o un patrón duro.
- 65 14. Sistema según la reivindicación 1, en el que los analitos son de uno o más agentes infecciosos.

15. Sistema según la reivindicación 14, en el que se selecciona al menos un agente infeccioso de entre virus de la gripe, VIH, virus de la hepatitis, adenovirus, enterovirus y virus parainfluenza.
- 5 16. Sistema según la reivindicación 15, en el que dicho(s) agente(s) infeccioso(s) son virus de la gripe seleccionados independientemente de entre gripe A, B, C.
17. Sistema según la reivindicación 16, en el que el sistema detecta antígenos H1 y H3 de la gripe tipo A.
- 10 18. Sistema según la reivindicación 16, en el que el sistema detecta la gripe H1N1 o H5.

FIGURA 1

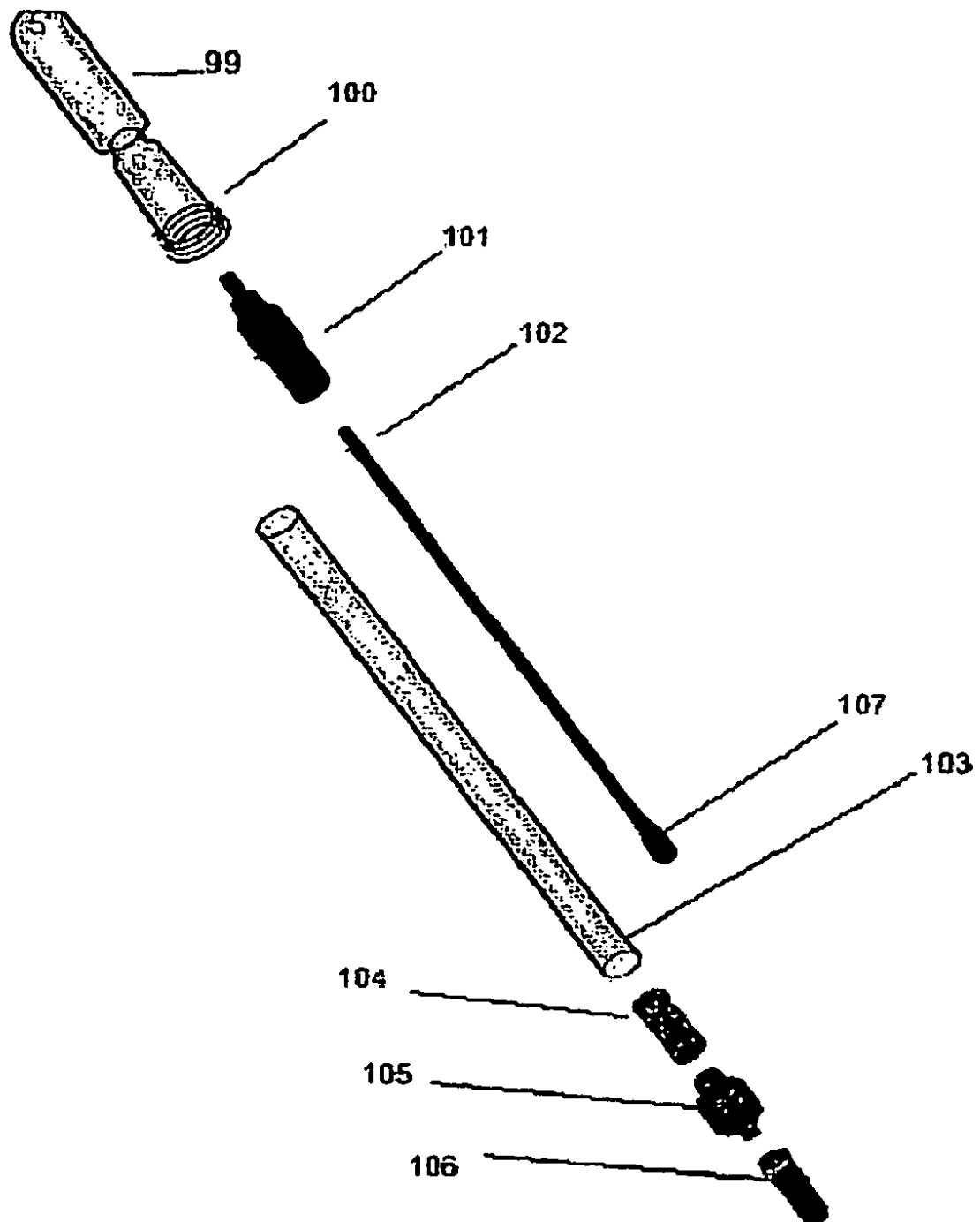


FIGURA 2A

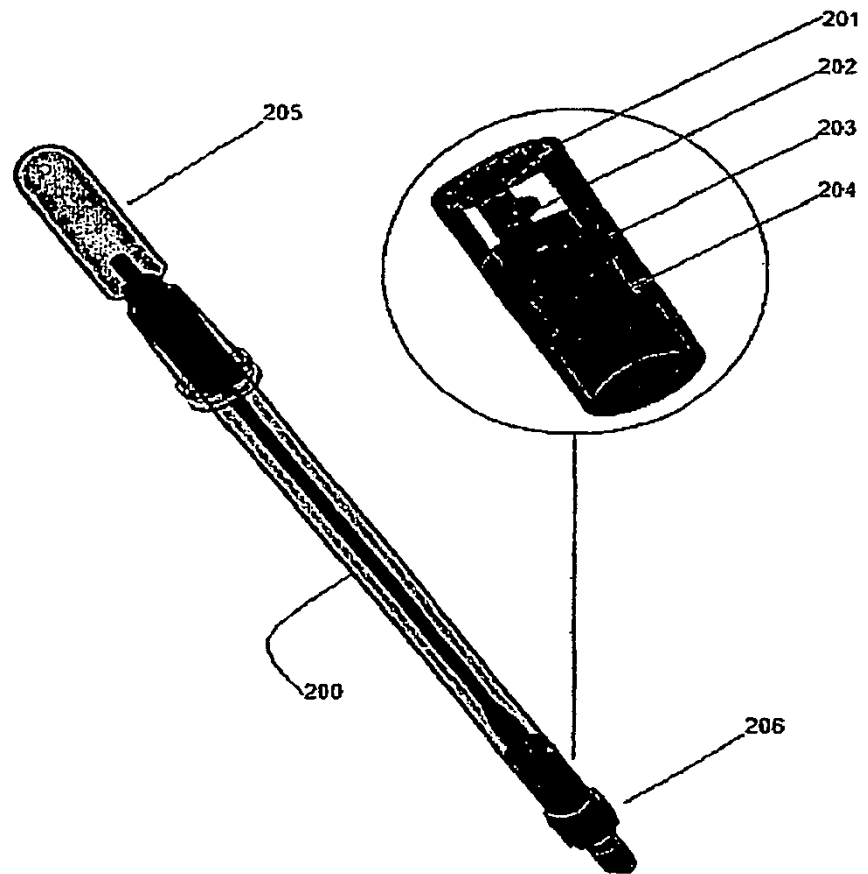


FIGURA 2B

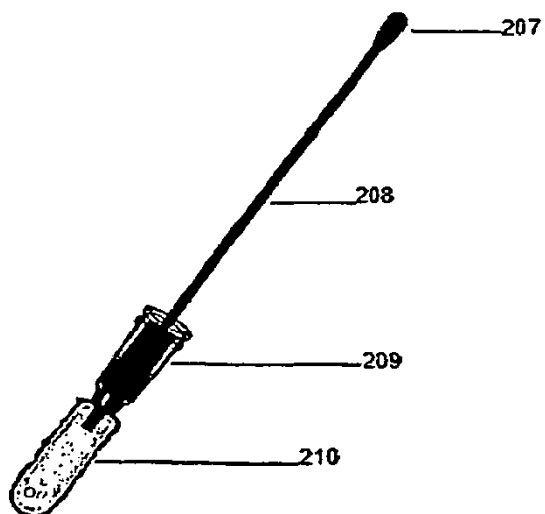


FIGURA 3

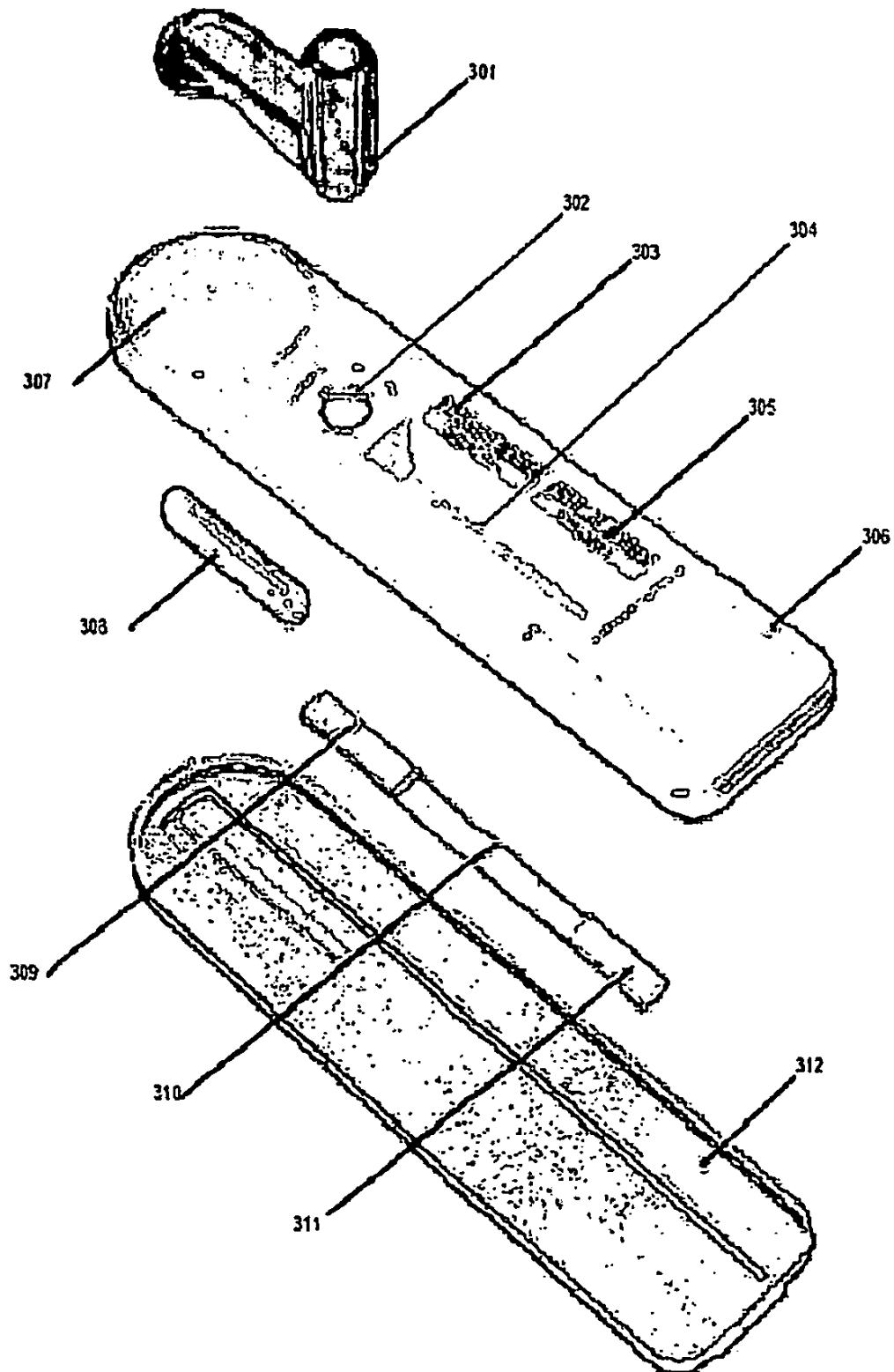


FIGURA 4

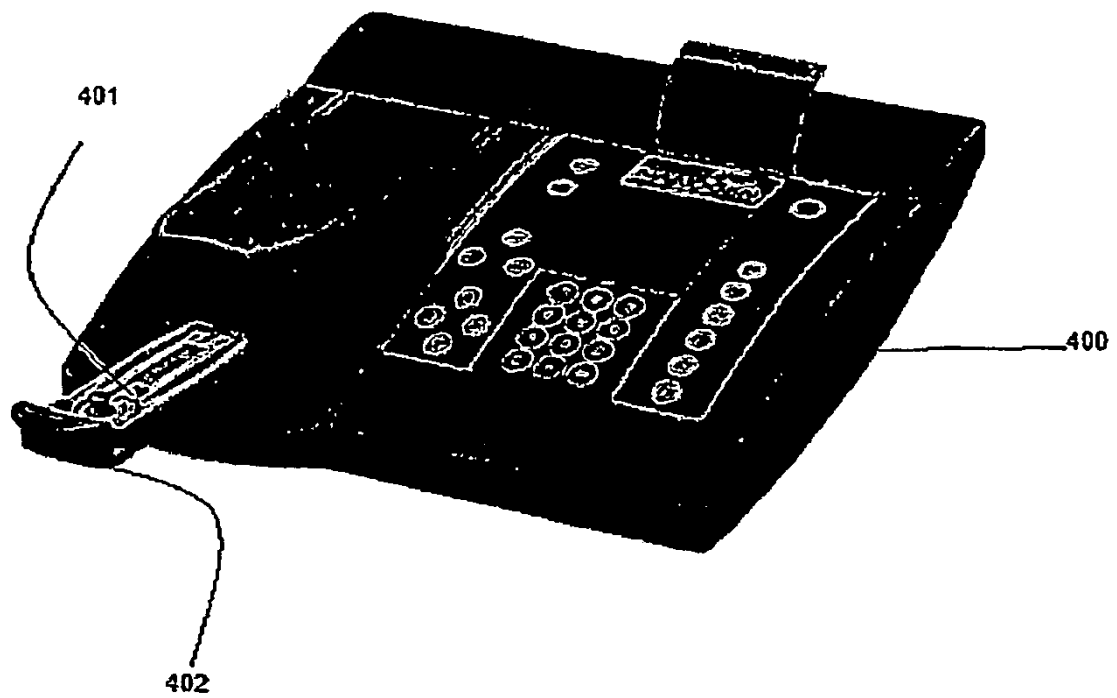


FIGURA 5

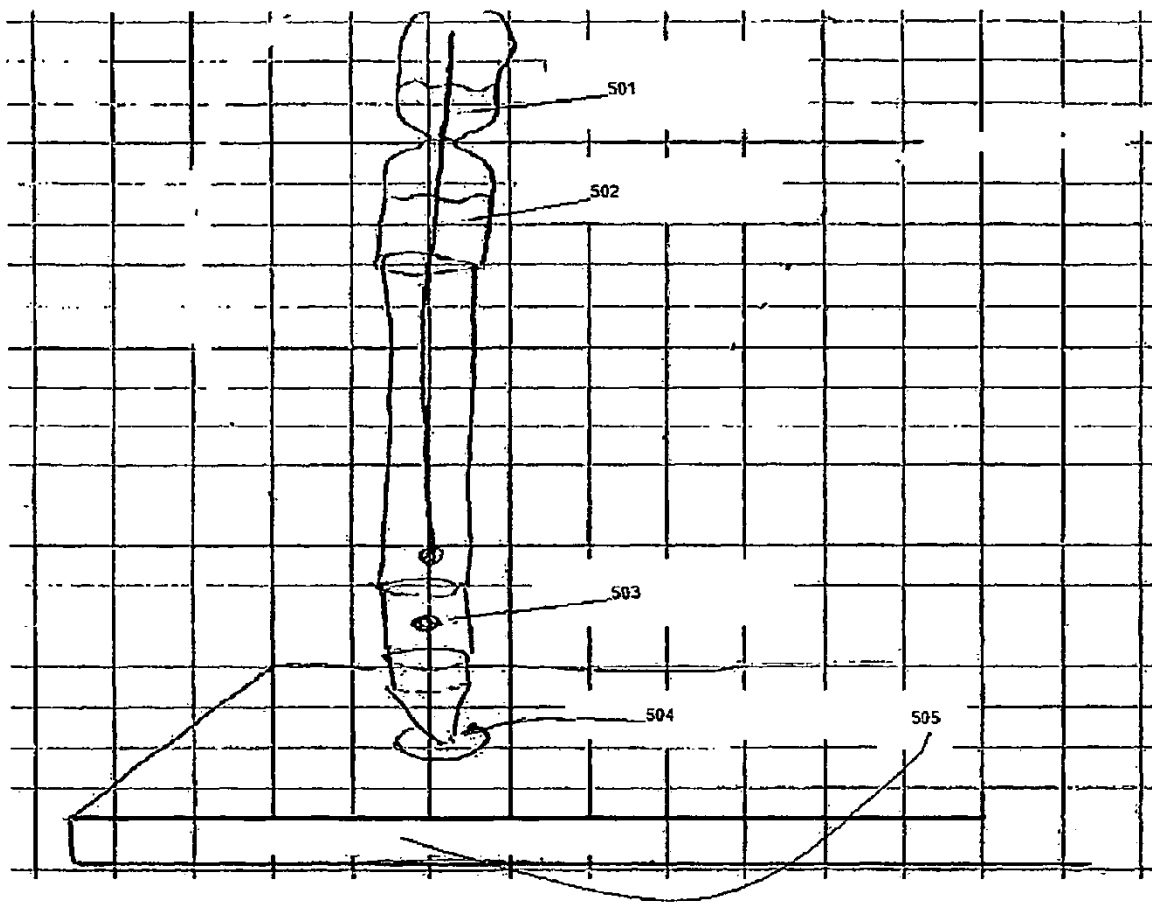


FIGURA 6

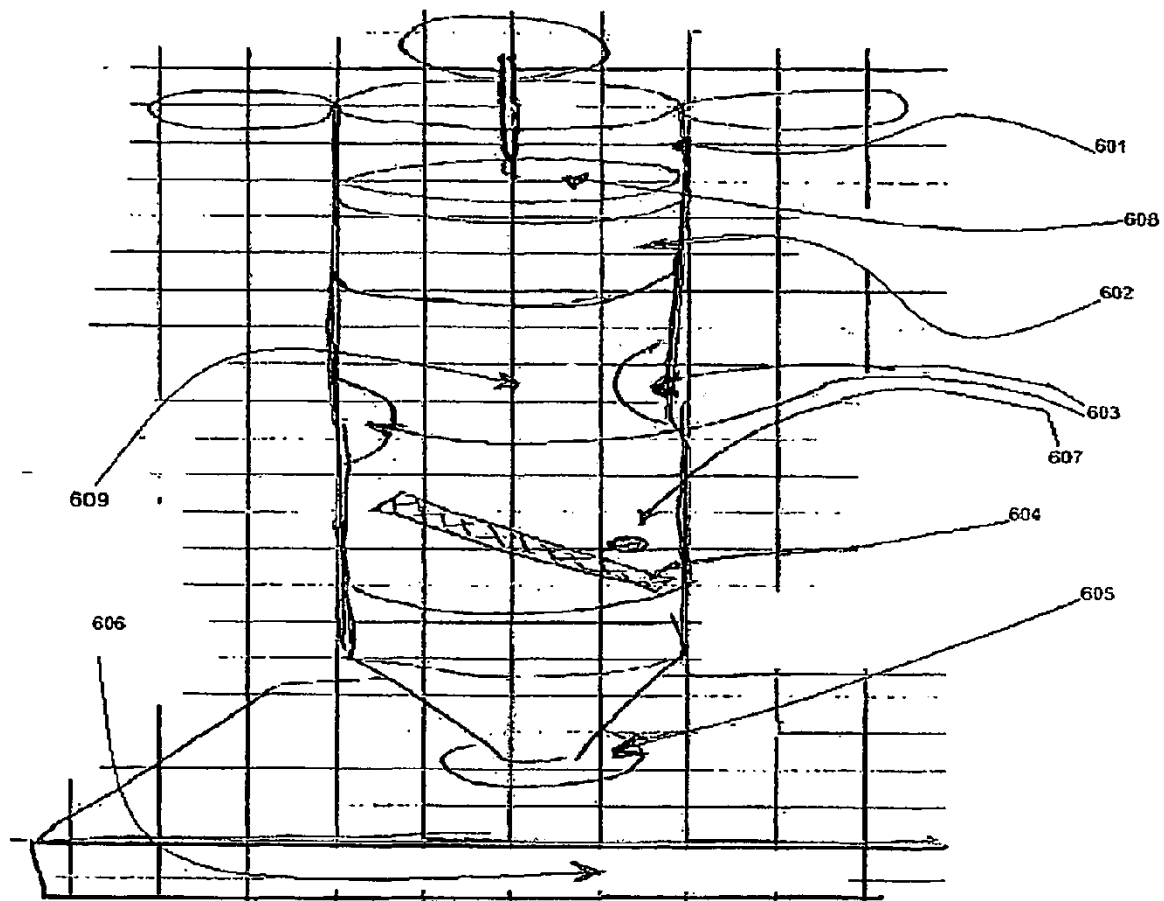


FIGURA 7

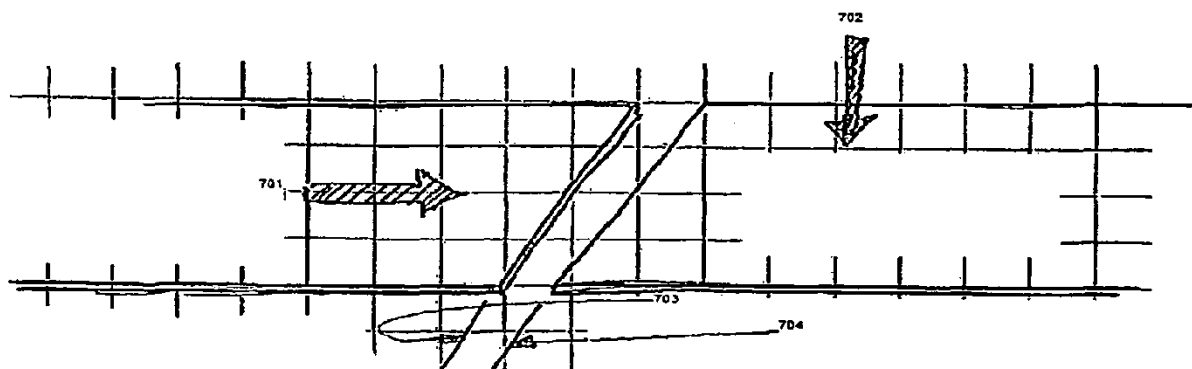


FIGURA 8

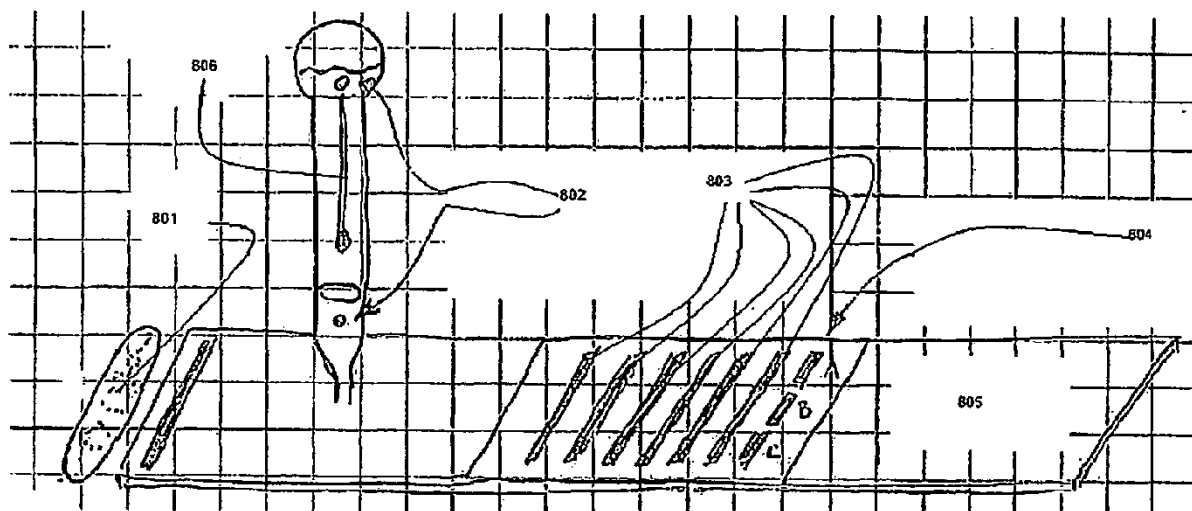


FIGURA 9A y 9B

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

A

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

FIGURAS 10A y10B



FIGURA 11



FIGURA 12

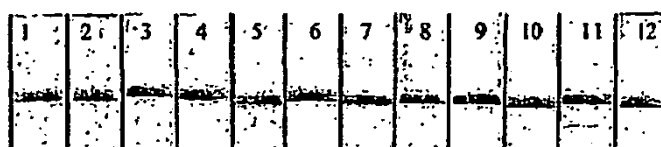


FIGURA 13

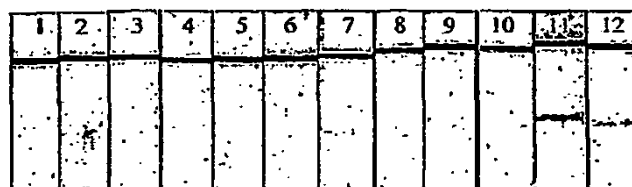


FIGURA 14

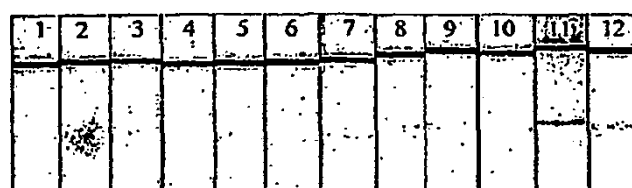


FIGURA 15

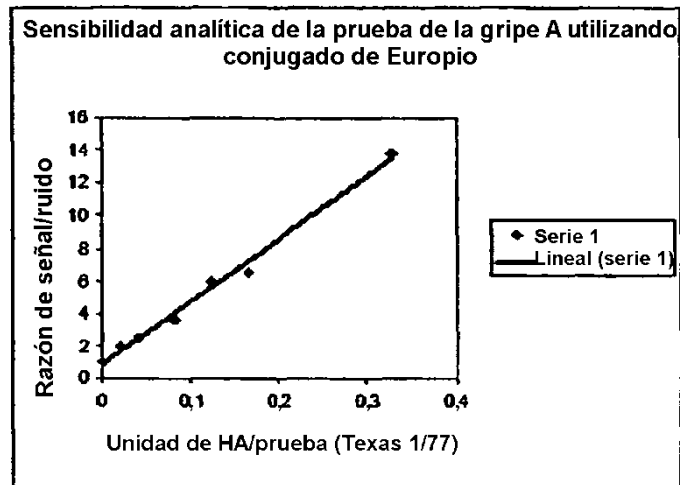


FIGURA 16

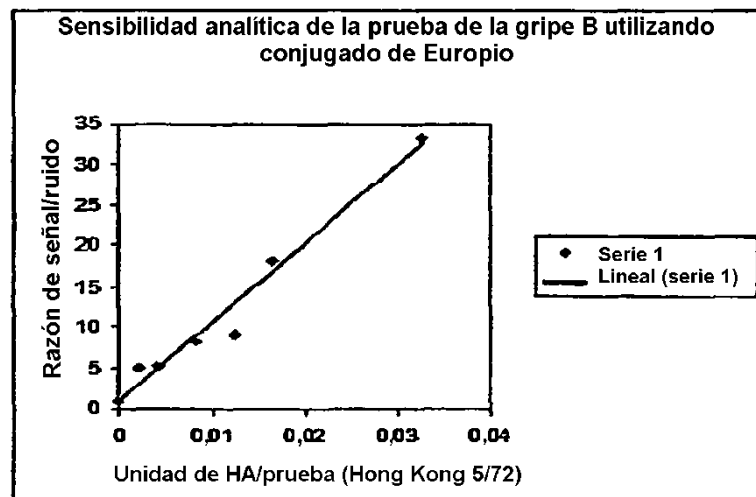


FIGURA 17

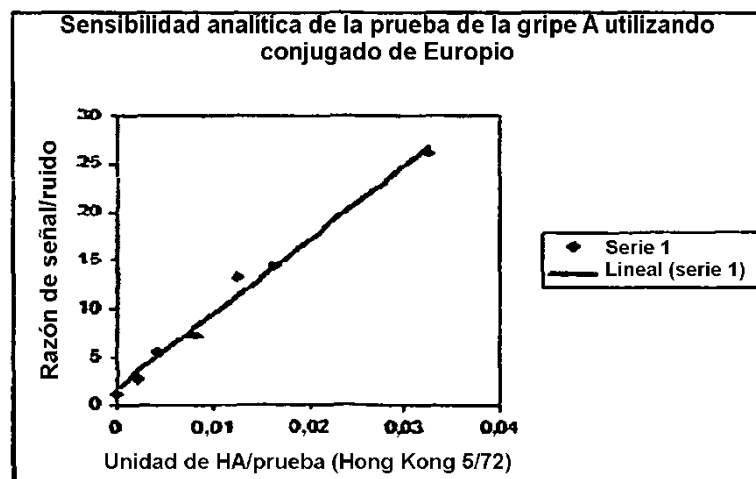


FIGURA 18

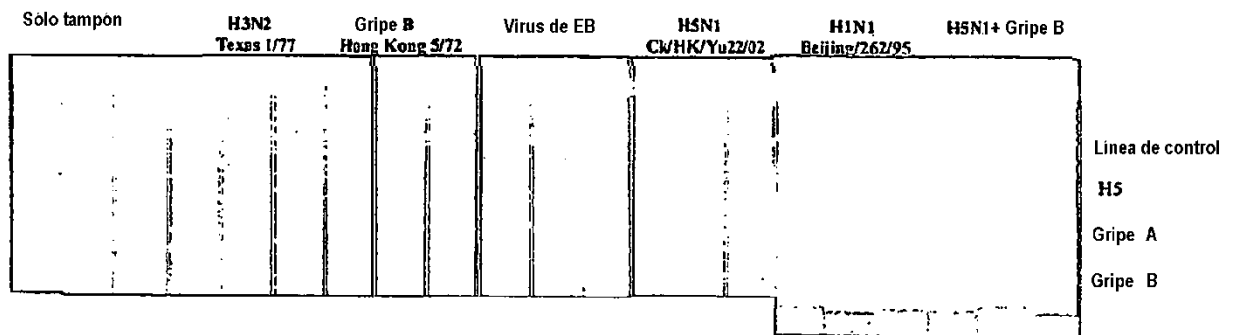


FIGURA 19

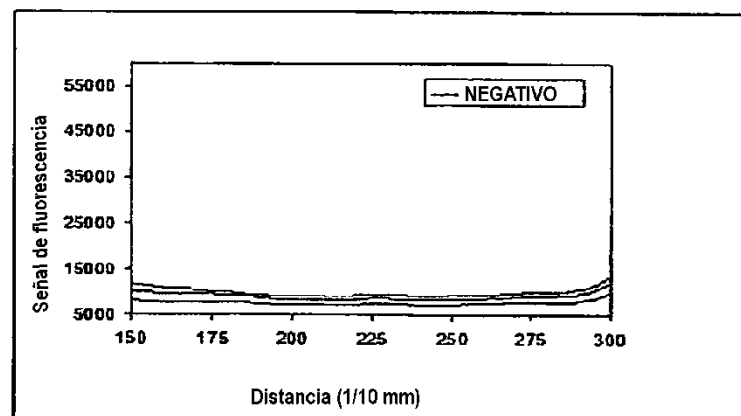


FIGURA 20

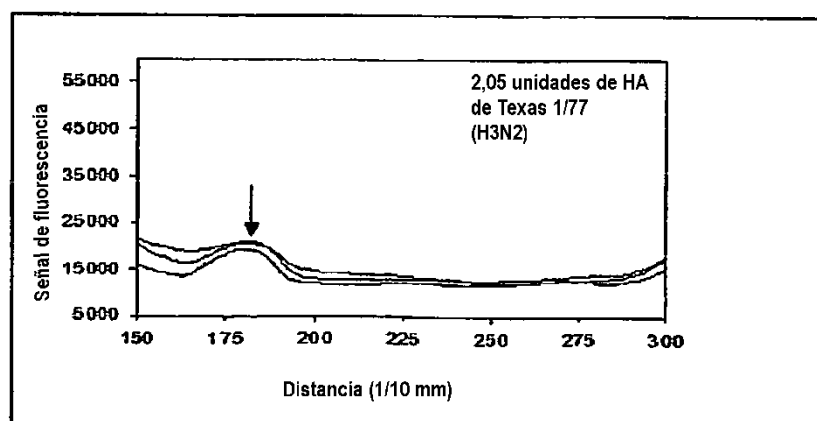


FIGURA 21

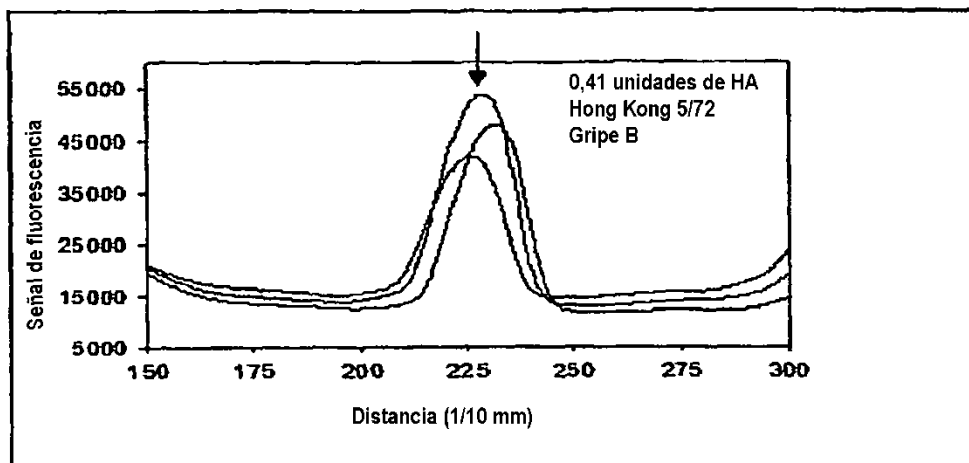


FIGURA 22

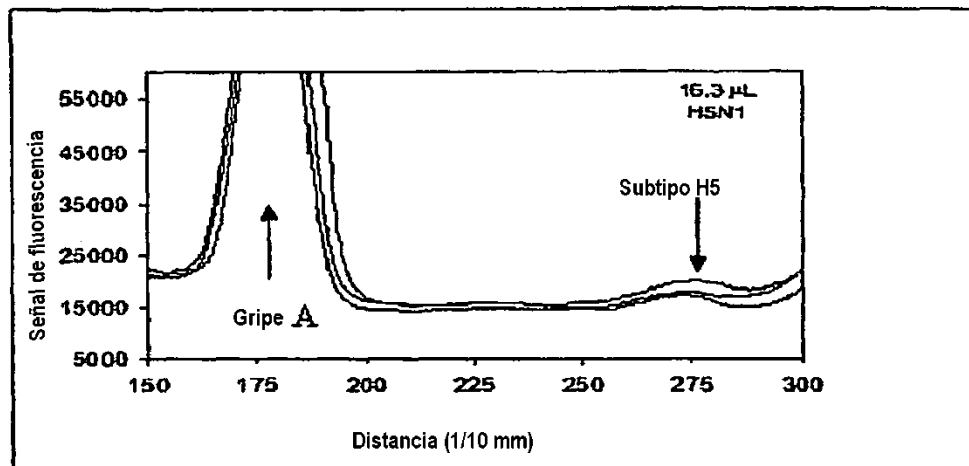


FIGURA 23

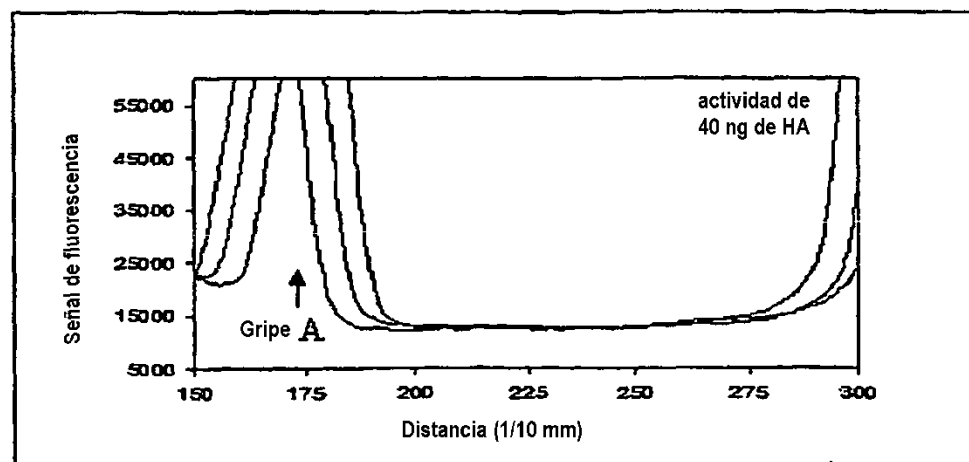


FIGURA 24

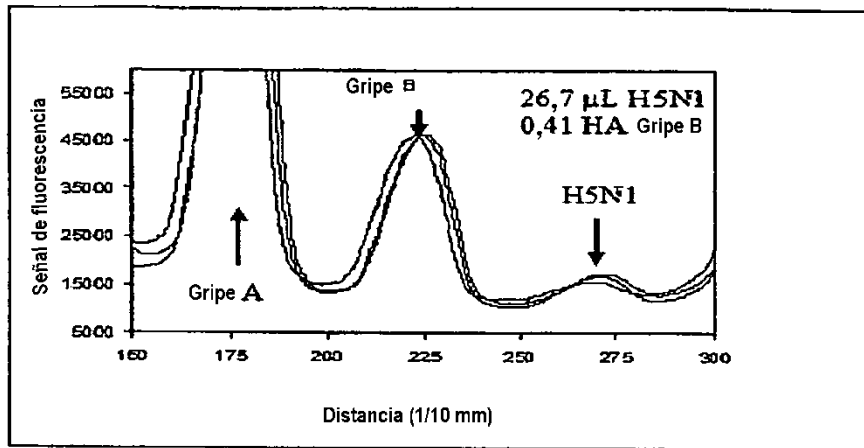


FIGURA 25

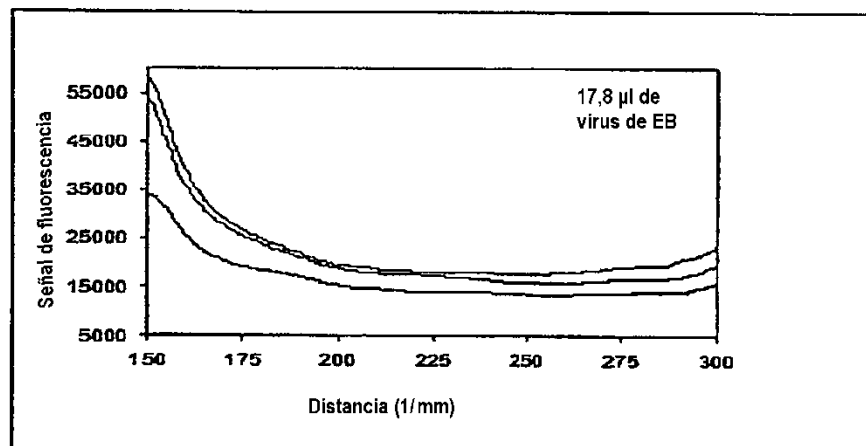


FIGURA 26

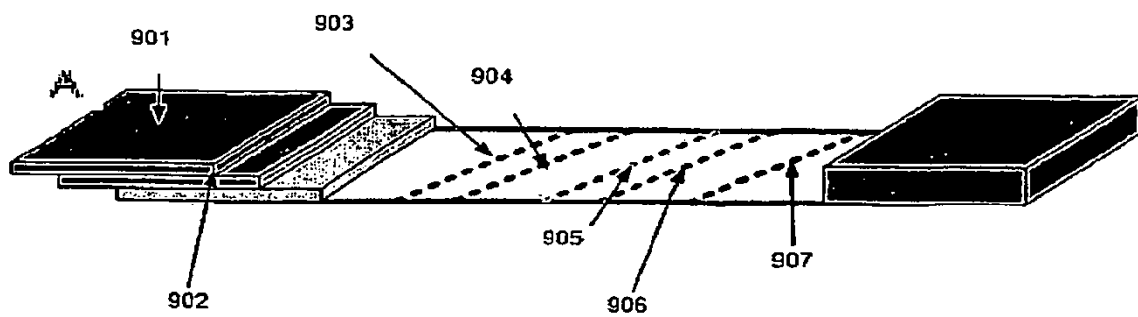


FIGURA 27

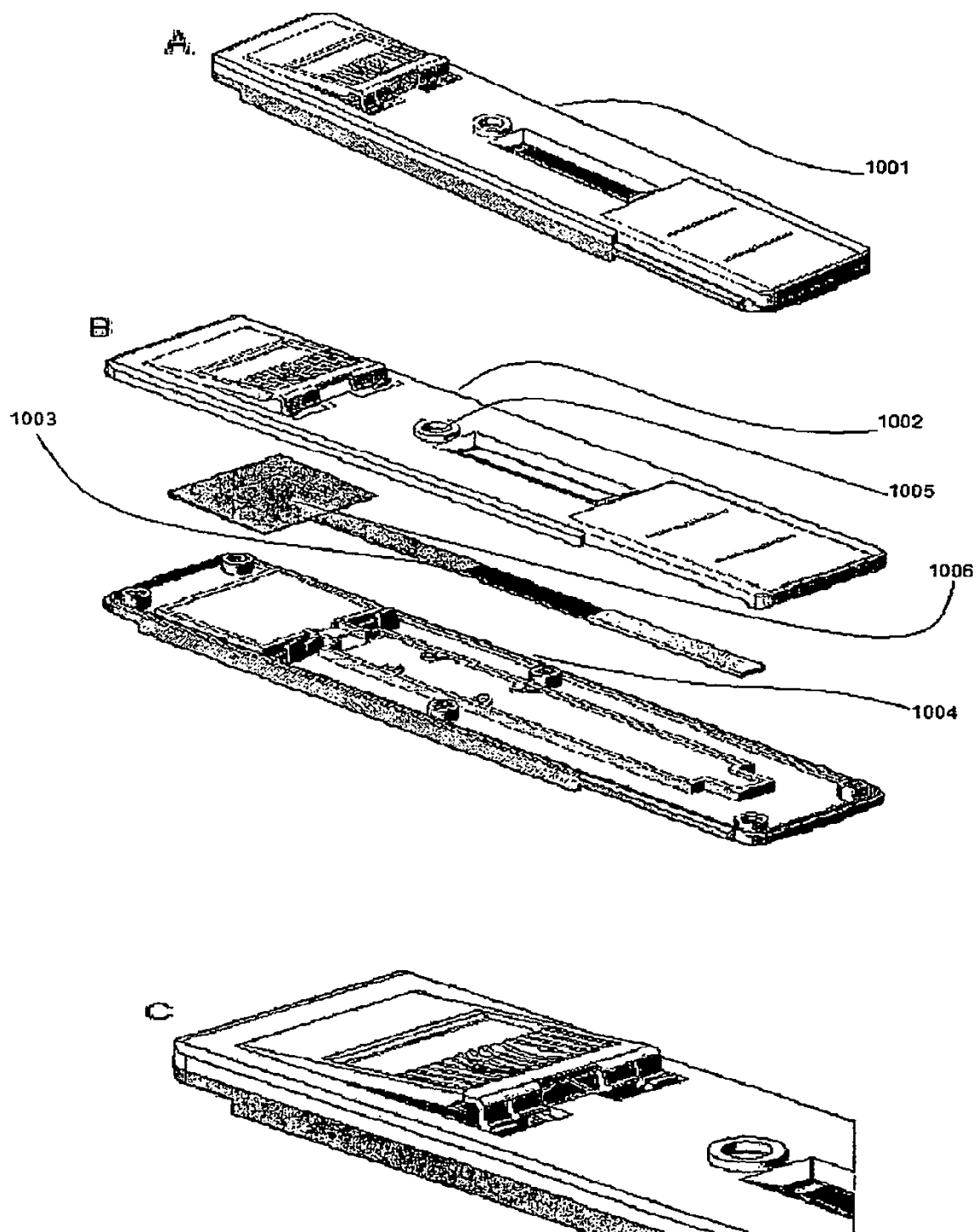
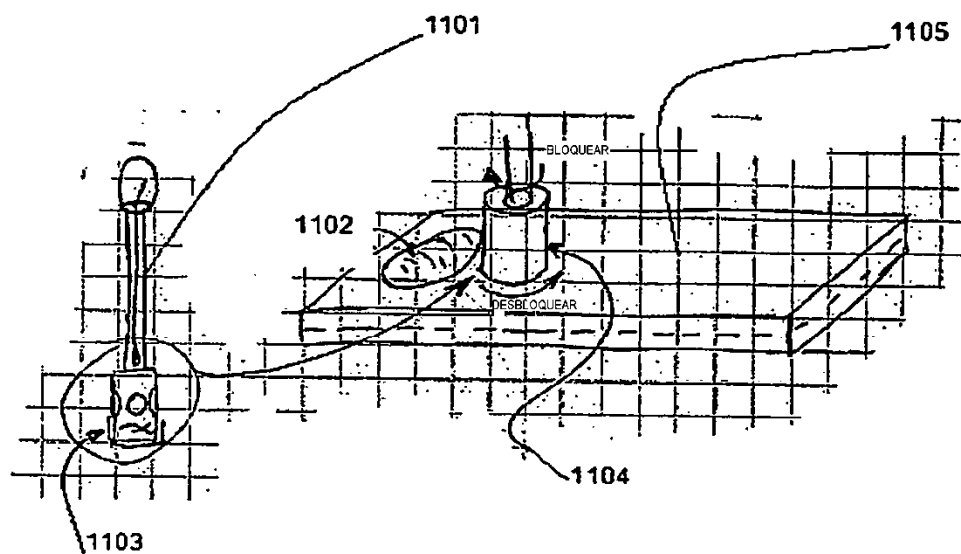


FIGURA 28

A

FIGURA 28



B

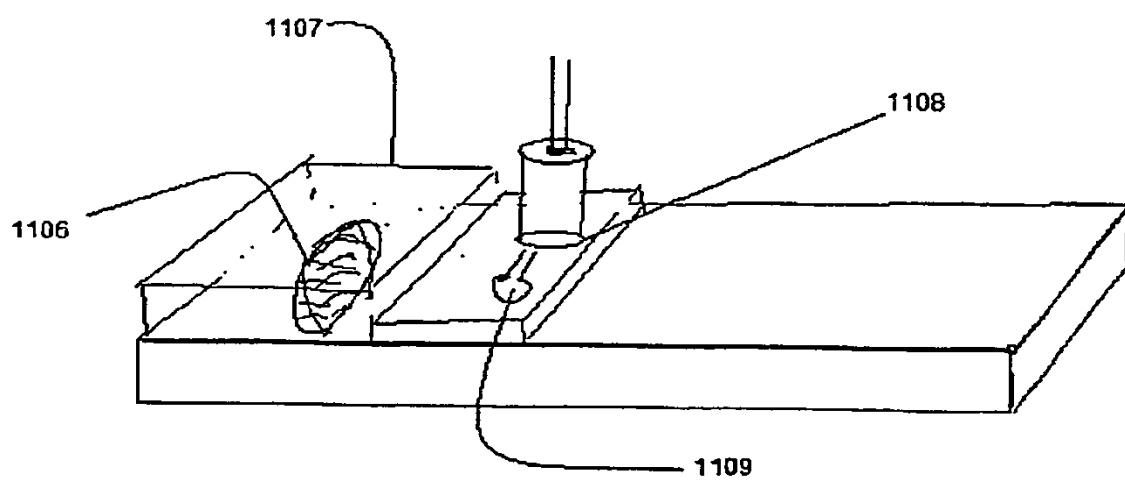
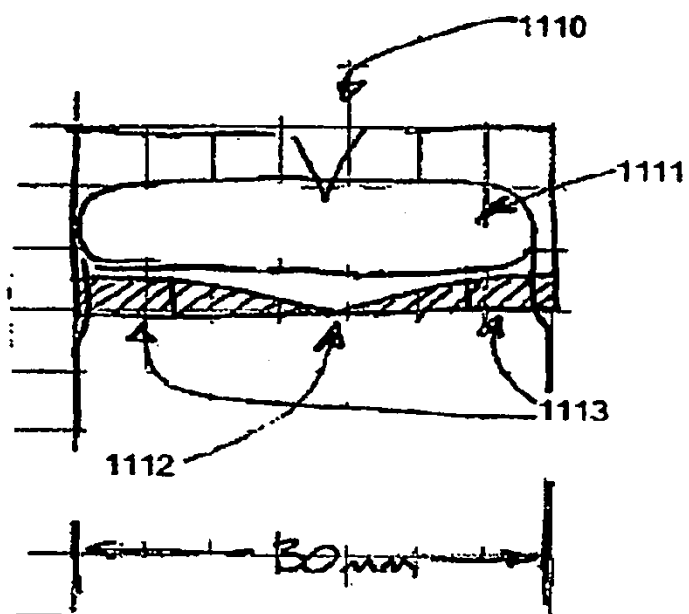


FIGURA 28C Y 28D

C



D

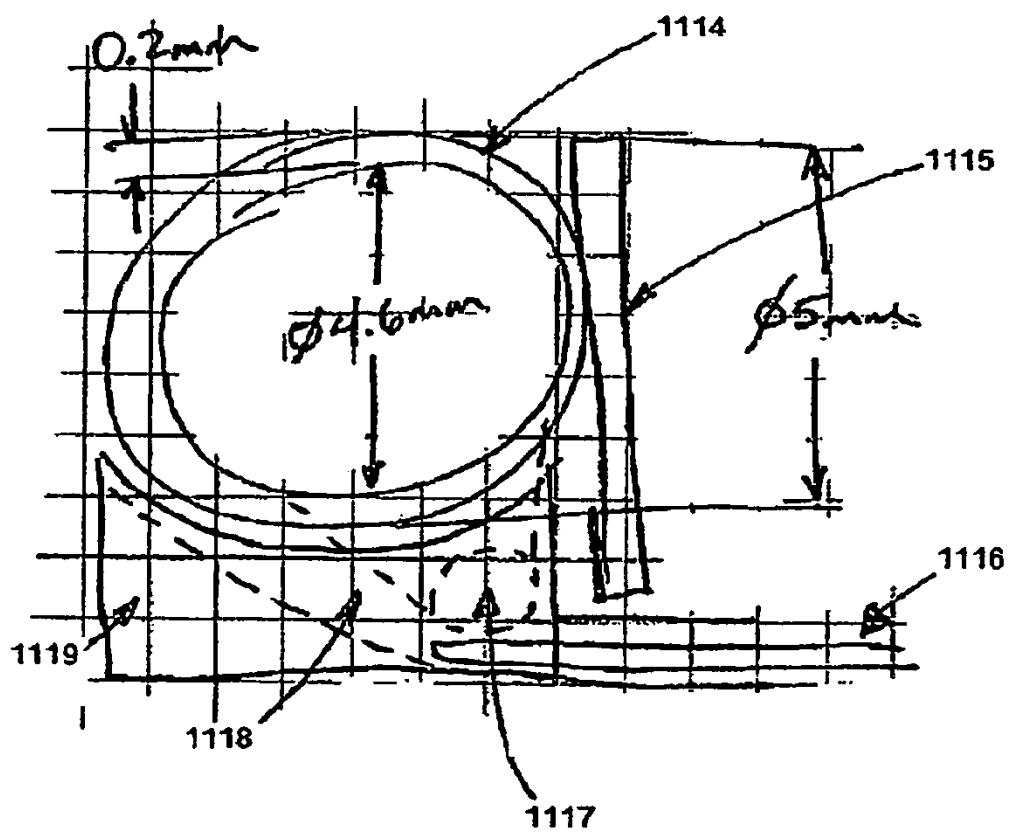


FIGURA 29

A

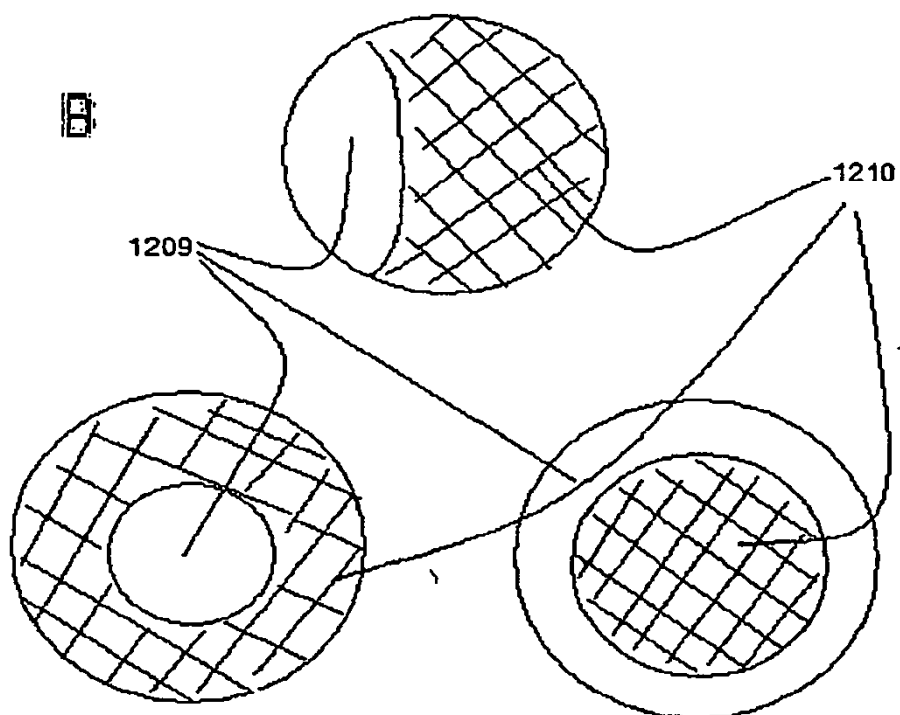
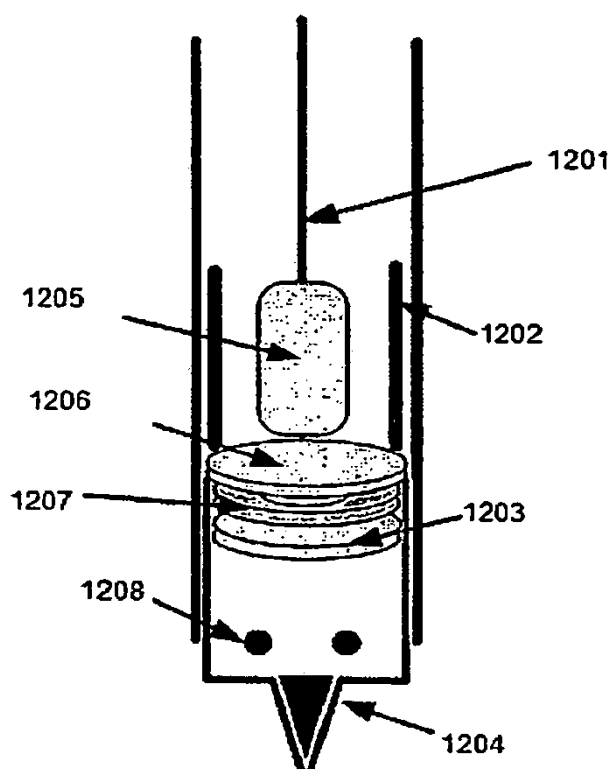
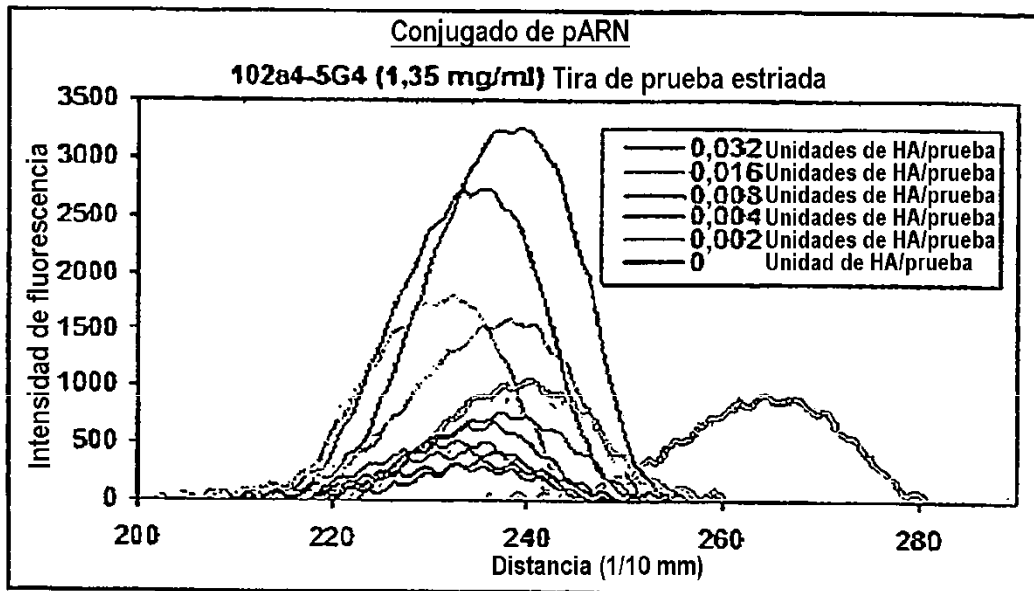


FIGURA 30

A



B

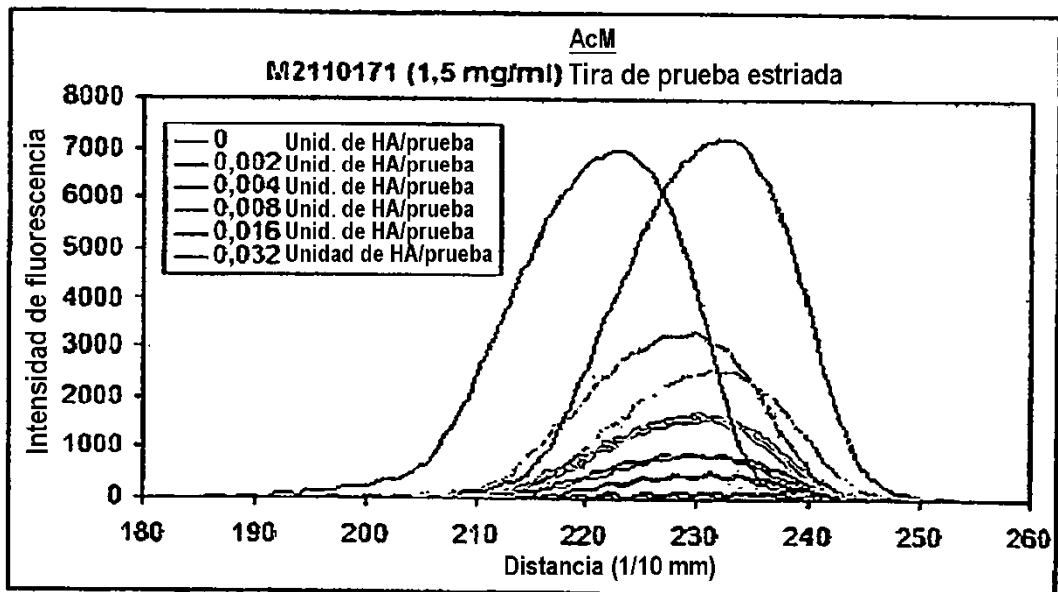


FIGURA 31

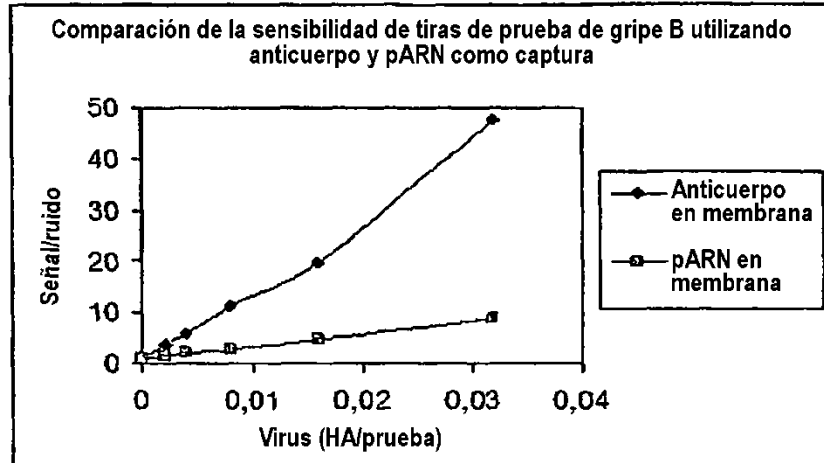


FIGURA 32

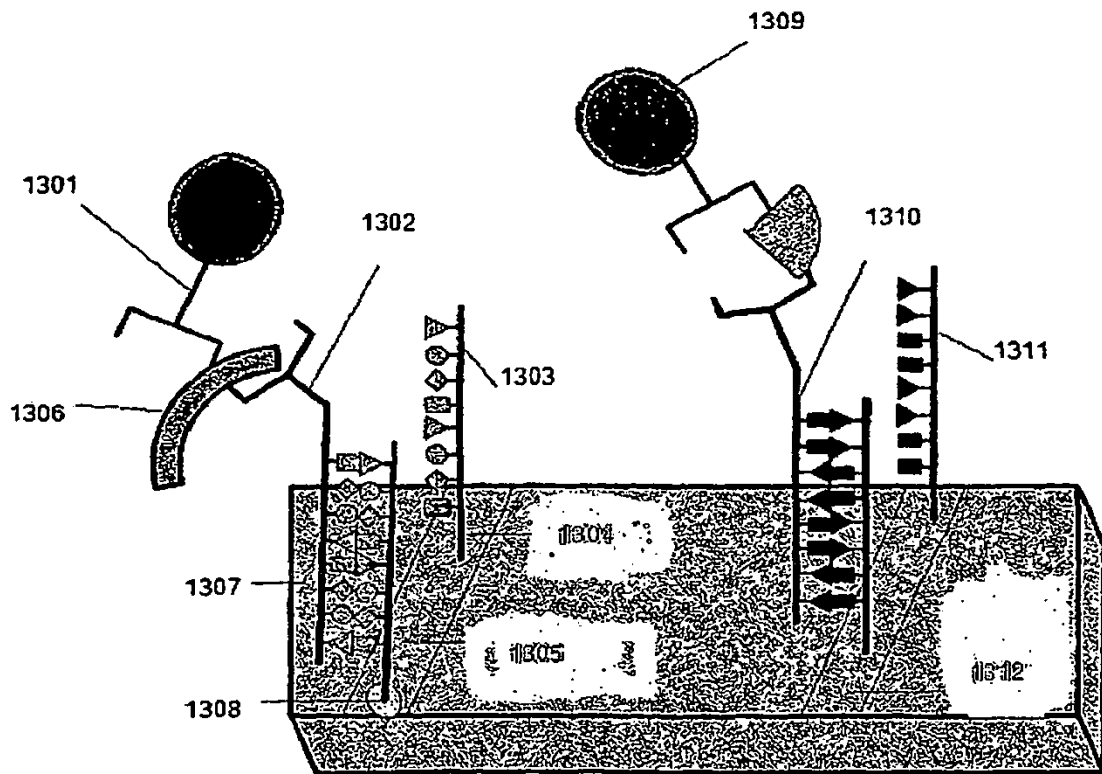


FIGURA 33

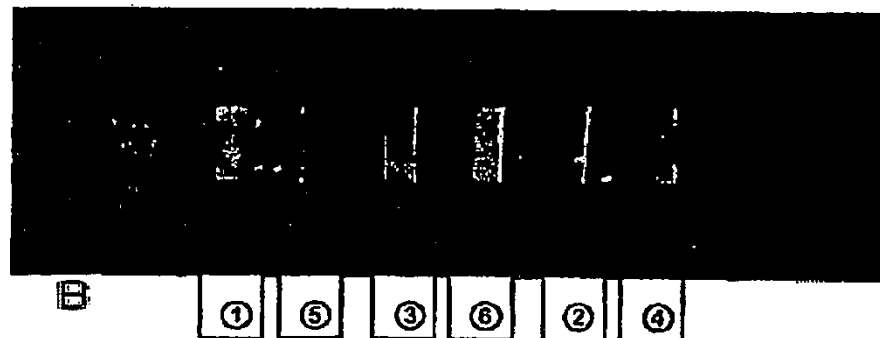
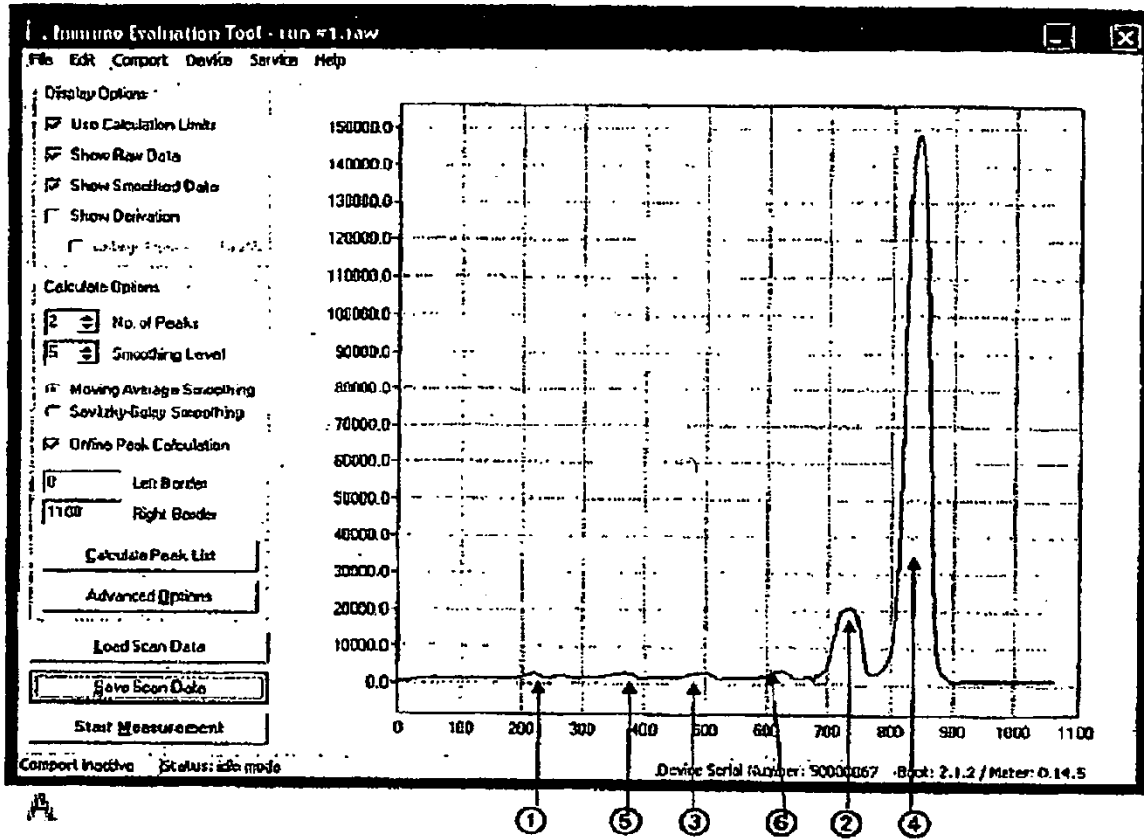
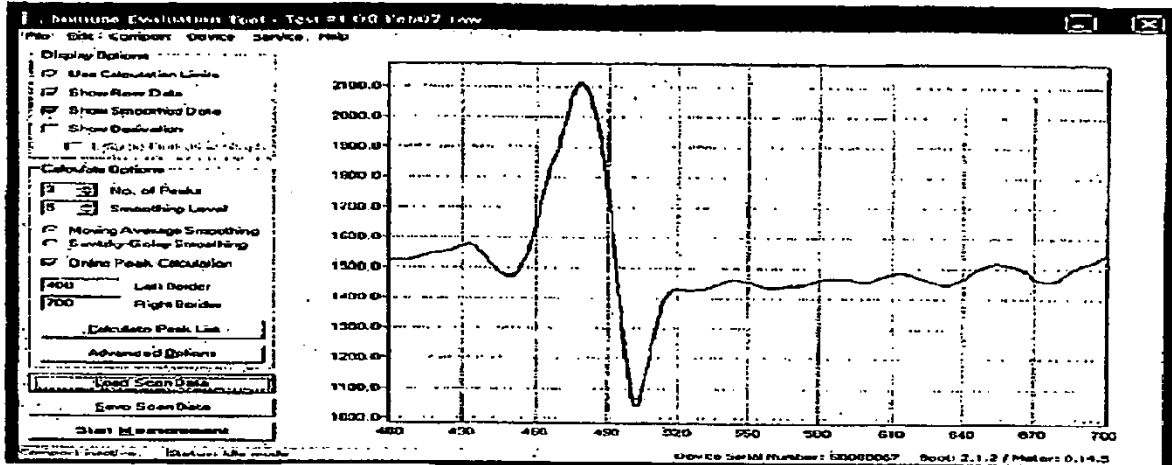
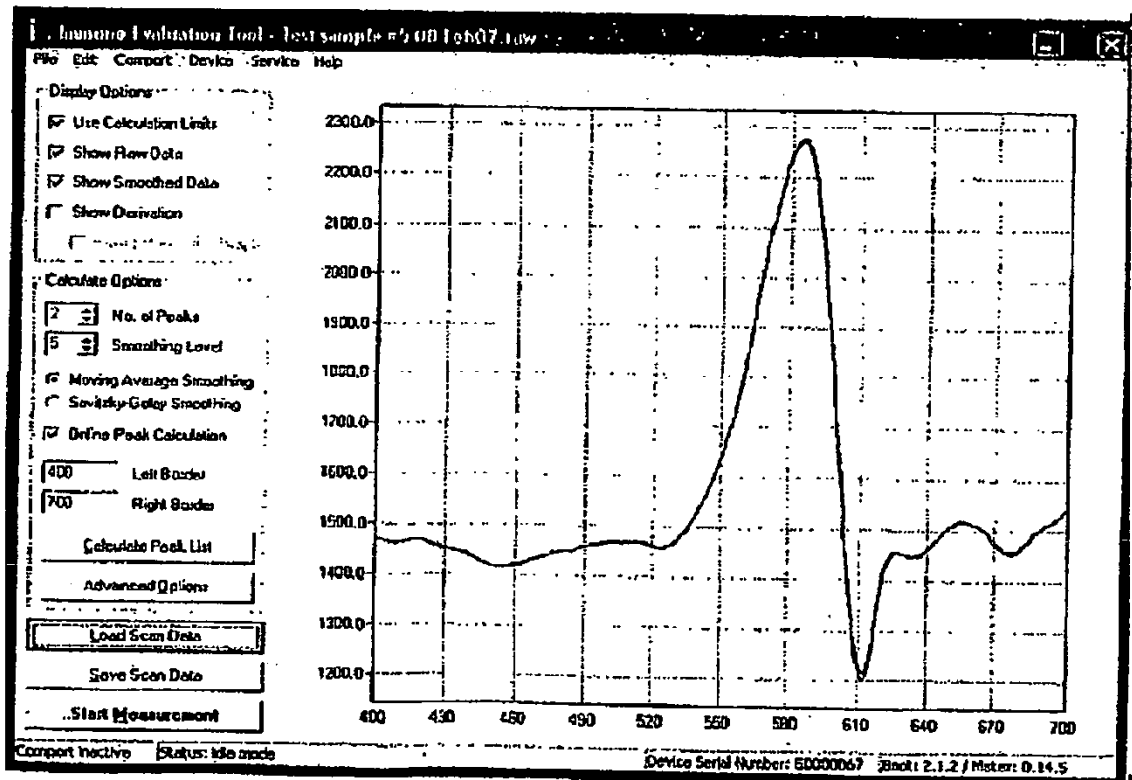


FIGURA 33

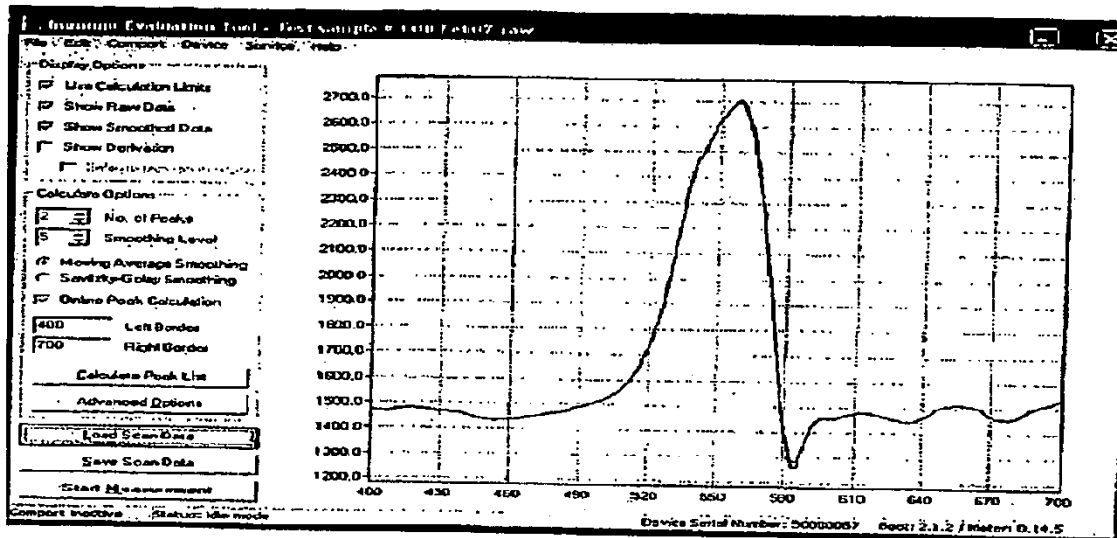


Este gráfico es la concentración de europio n.º 1, aproximadamente 2100 cuentas

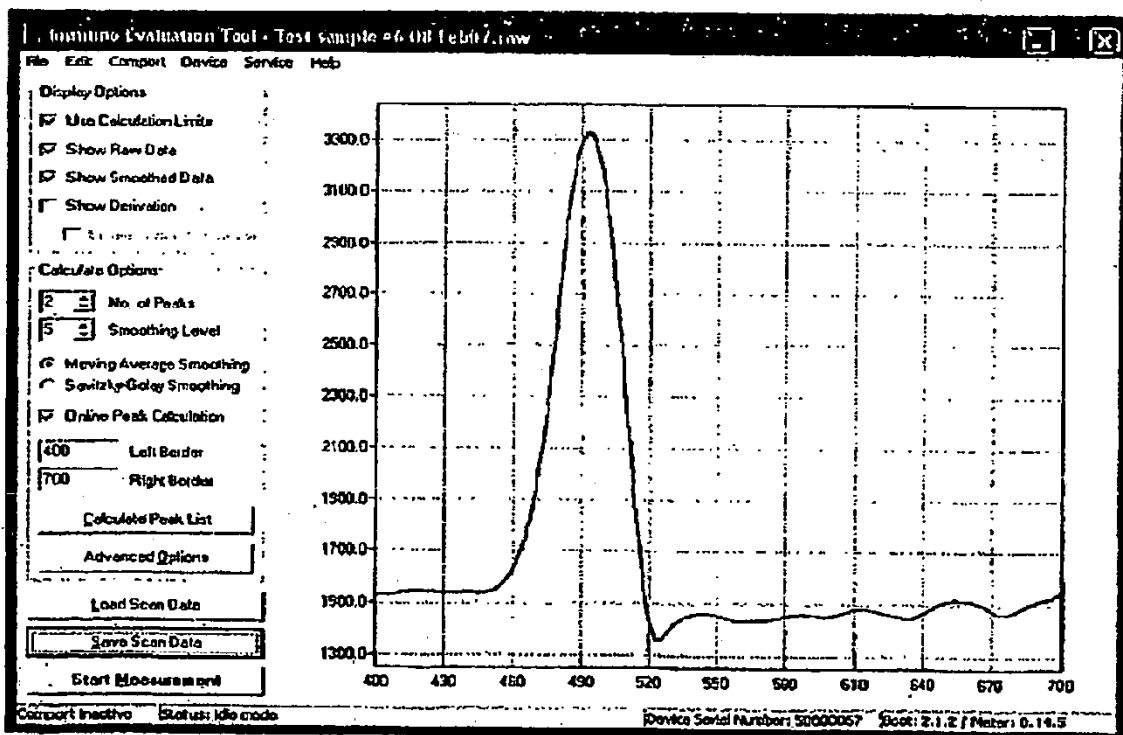


Este gráfico es la concentración de europio n.º 5, aproximadamente 2280 cuentas

FIGURA 33

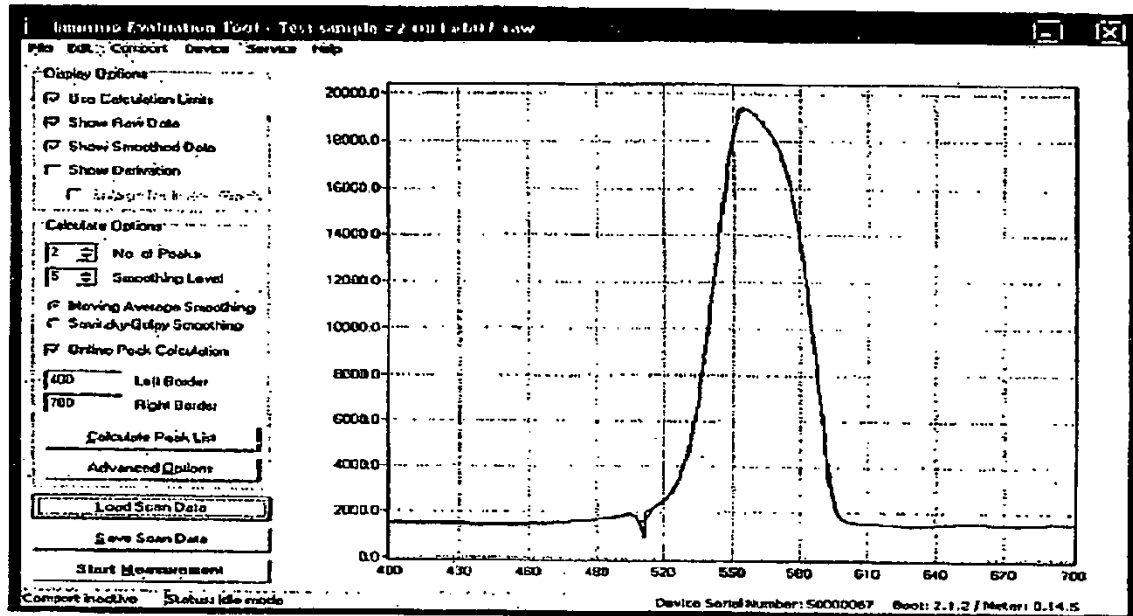


E Este gráfico es la concentración de europio n.º 3, aproximadamente 2700 cuentas



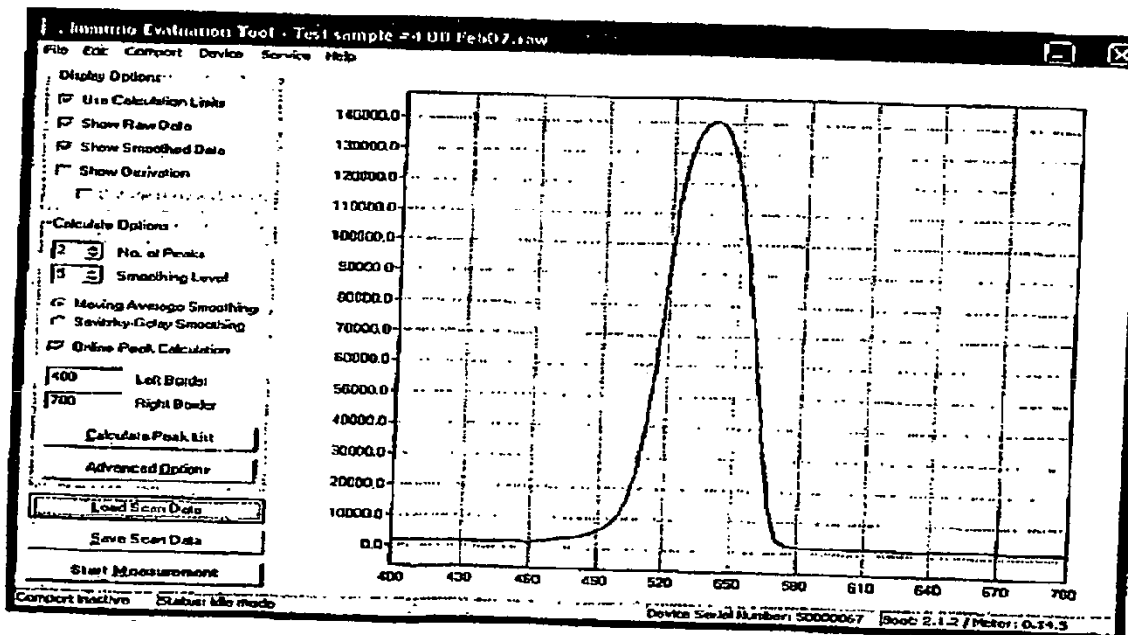
F Este gráfico es la concentración de europio n.º 6, aproximadamente 3310 cuentas

FIGURA 33



IC

Este gráfico es la concentración de europio n.º 2, aproximadamente 19500 cuentas



IC

Este gráfico es la concentración de europio n.º 4, aproximadamente 140.000 cuentas

FIGURA 34

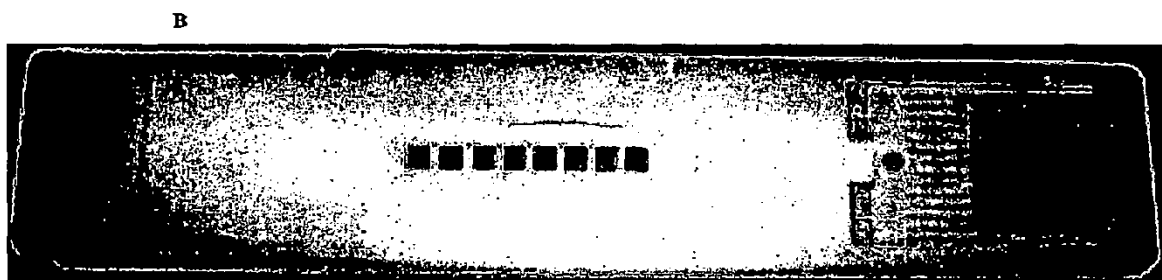
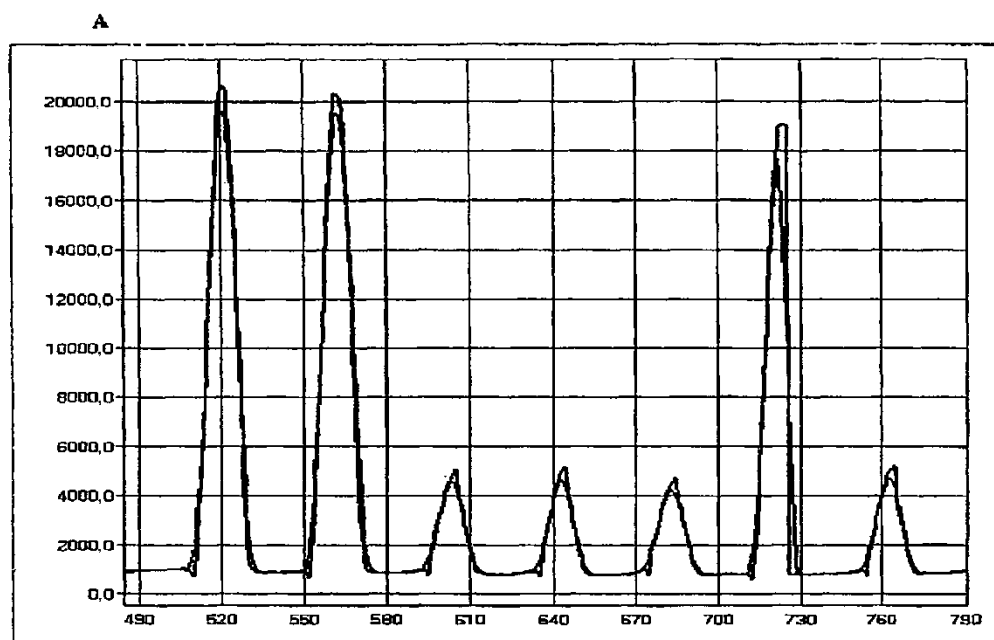


FIGURA 35

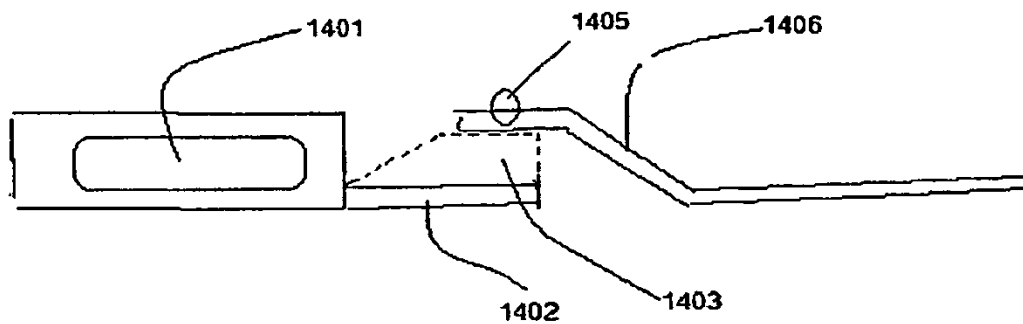


FIGURA 36

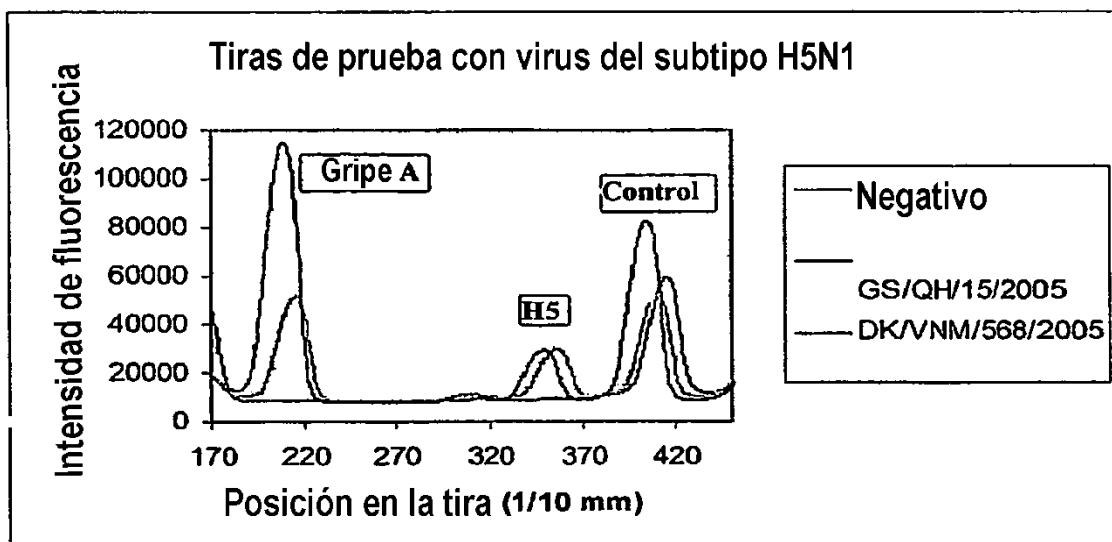


FIGURA 37

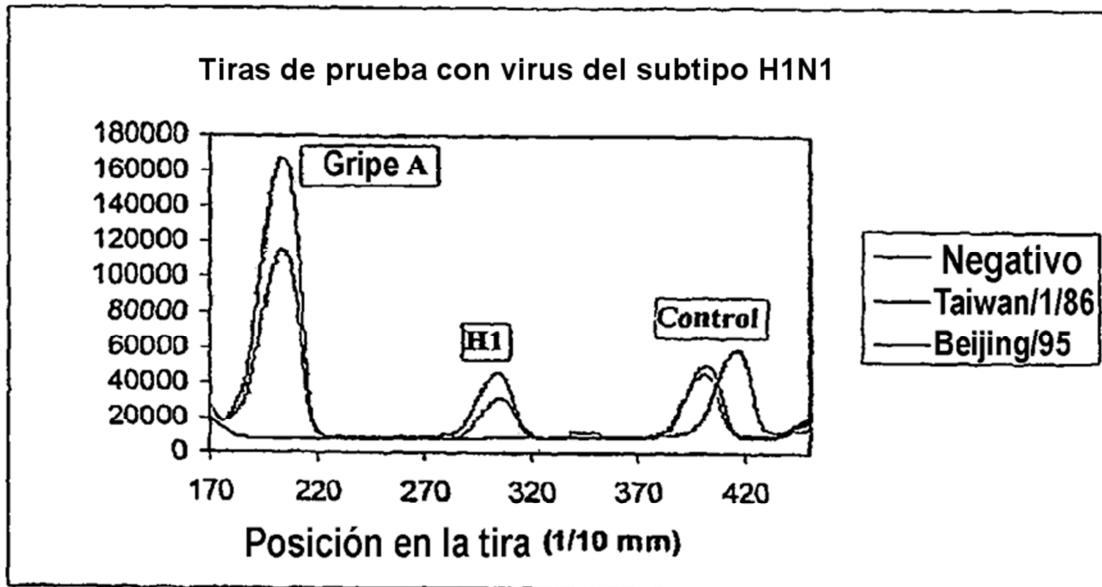


FIGURA 38

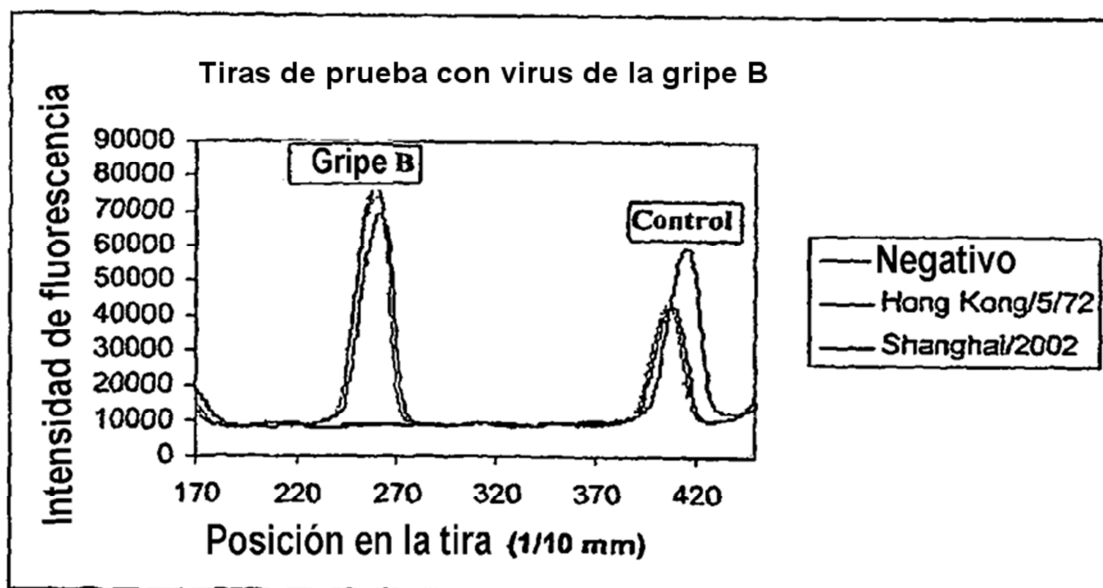


FIGURA 39

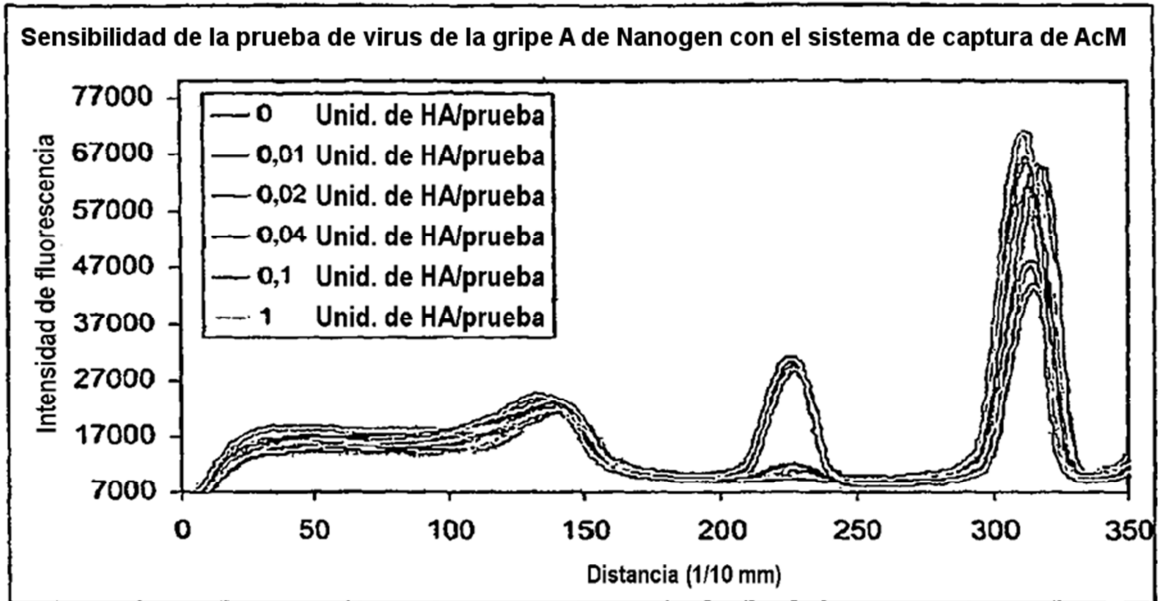


FIGURA 40

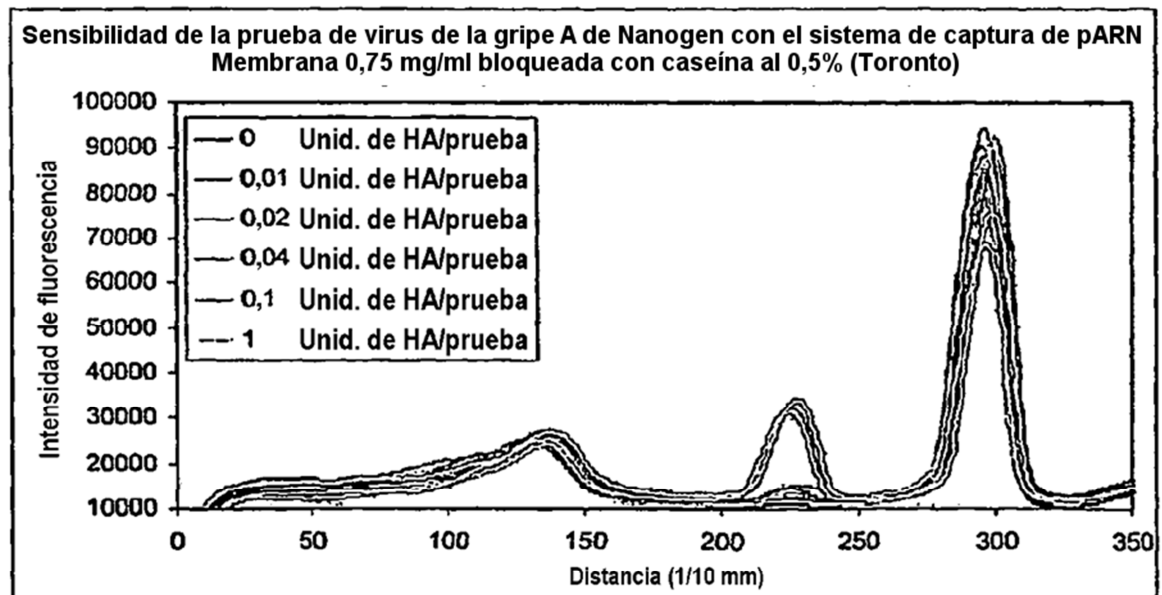


FIGURA 41

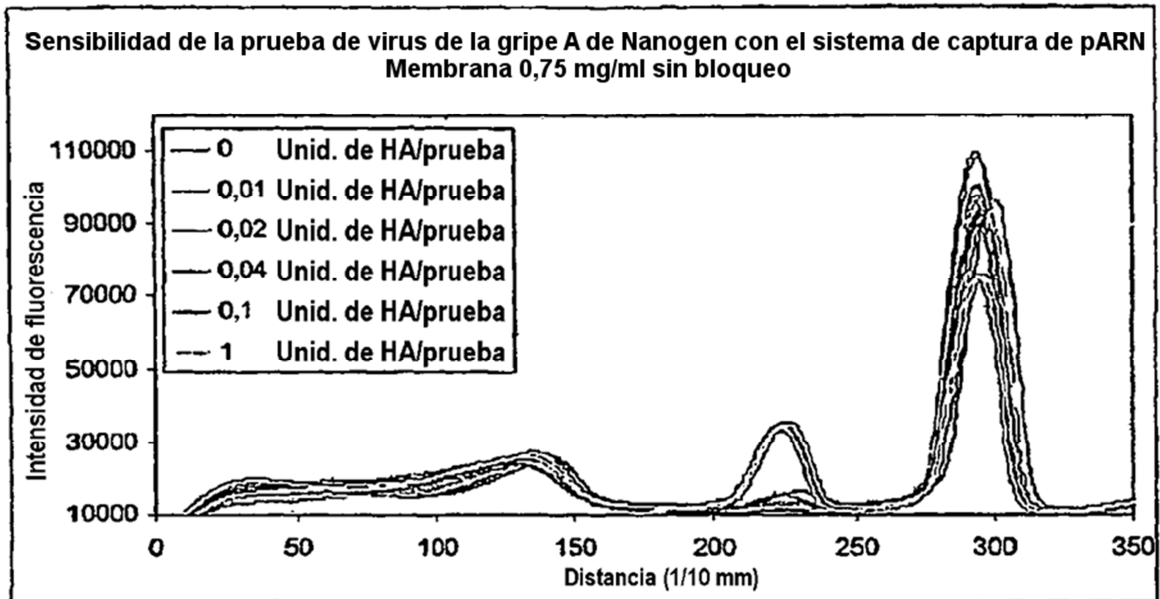


FIGURA 42

