

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 832 491**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2006 E 18188944 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3425399**

54 Título: **Dispositivo de inmunoensayo de doble ruta**

30 Prioridad:

11.03.2005 US 660695 P

13.05.2005 US 680884 P

30.06.2005 US 172298

02.12.2005 US 741628 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.06.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ESFANDIARI, JAVANBAKHSH

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 832 491 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

Dispositivo de inmunoensayo de doble ruta

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere ampliamente a dispositivos de inmunoensayo y su uso. Más particularmente, esta invención se refiere a tiras reactivas cromatográficas rápidas para la detección de un ligando en un fluido corporal.

2. Estado de la técnica

- 10 Se han usado muchos tipos de ensayos de ligando-receptor para detectar la presencia de diversas sustancias, a menudo denominadas generalmente ligandos, en fluidos corporales tales como sangre, orina o saliva. Estos ensayos implican reacciones de anticuerpos antigénicos, conjugados sintéticos que comprenden poliestireno radioactivo, enzimático, fluorescente o etiquetas de soles metálicos o poliestireno observables visualmente, y cámaras de reactor especialmente diseñadas. En todos estos ensayos, hay un receptor, por ejemplo, un anticuerpo, que es específico para el ligando o antígeno seleccionado, y un medio para detectar la presencia, y en algunos casos la cantidad, del producto de reacción del ligando-receptor. Algunas pruebas están diseñadas para realizar una determinación
- 15 cuantitativa, pero en muchas circunstancias todo lo que se requiere es una indicación cualitativa positiva/negativa. Los ejemplos de tales ensayos cualitativos incluyen la tipificación sanguínea, la mayoría de los tipos de análisis de orina, pruebas de embarazo y pruebas de SIDA. Para estas pruebas, se prefiere un indicador visualmente observable, tal como la presencia de aglutinación o un cambio de color.

- 20 Incluso los ensayos cualitativos deben ser muy sensibles debido a la concentración a menudo pequeña del ligando de interés en el fluido de prueba. Los falsos positivos también pueden ser problemáticos, en particular con la aglutinación y otros métodos de detección rápida, tales como las pruebas con tira reactiva y cambio de color. Debido a estos problemas, se han desarrollado los denominados ensayos "sándwich" y otros mecanismos de detección sensibles que usan soluciones metálicas u otros tipos de partículas coloreadas.

- 25 En un ensayo de "sándwich", un analito diana tal como un antígeno está "intercalado" entre un anticuerpo marcado y un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido. El ensayo se lee observando la presencia y/o la cantidad de complejo de anticuerpo marcado con antígeno unido. En un inmunoensayo de "competición", el anticuerpo unido a una superficie sólida se pone en contacto con una muestra que contiene una cantidad desconocida de analito de antígeno y con un antígeno marcado del mismo tipo. Luego se determina la cantidad de antígeno marcado unido a la superficie sólida para proporcionar una medida indirecta de la cantidad de analito de antígeno en la muestra.

- 30 Debido a que estos y otros ensayos pueden detectar tanto anticuerpos como antígenos, generalmente se denominan ensayos inmunoquímicos de ligando-receptor o simplemente inmunoensayos.

- 35 Los dispositivos de inmunoensayo en fase sólida, ya sean del tipo sándwich o de competición, proporcionan una detección sensible de un analito en una muestra de fluido biológico tal como sangre, orina o saliva. Los dispositivos de inmunoensayo en fase sólida incorporan un soporte sólido al que se une un miembro de un par ligando-receptor, generalmente un anticuerpo, antígeno o hapteno. Las formas tempranas comunes de soportes sólidos eran placas, tubos o perlas de poliestireno que eran bien conocidos en los campos del radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático. En la última década, se han empleado como soportes sólidos un número de materiales porosos como nailon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

- 40 Se han descrito un número de kits de inmunoensayo autónomos que usan materiales porosos como portadores en fase sólida de componentes inmunoquímicos tales como antígenos, haptenos o anticuerpos. Estos kits suelen tener un diseño de tira reactiva, de flujo continuo o migratorio.

- 45 En las formas más comunes de ensayos con tira reactiva, tipificados por los kits de detección de la ovulación y el embarazo en el hogar, los componentes inmunoquímicos, tales como los anticuerpos, se unen a una fase sólida. El dispositivo de ensayo se "sumerge" para su incubación en una muestra que se sospecha contiene un analito de antígeno desconocido. Luego se agrega el anticuerpo marcado con enzima, ya sea simultáneamente o después de un período de incubación. Luego, el dispositivo se lava y se inserta en una segunda solución que contiene un sustrato para la enzima. El marcador enzimático, si está presente, interactúa con el sustrato, provocando la formación de productos coloreados que se depositan como un precipitado sobre la fase sólida o producen un cambio de color visible en la solución del sustrato.

- 50 Los dispositivos de inmunoensayo del tipo de flujo continuo se diseñaron para obviar la necesidad de una incubación extensa y etapas de lavado engorrosos asociados con los ensayos con tira reactiva. Valkirs et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,632,901, describen un dispositivo que comprende un anticuerpo (específico para un analito de antígeno diana) unido a una membrana o filtro poroso al que se agrega una muestra líquida. A medida que el líquido fluye a través de la membrana, el analito diana se une al anticuerpo. La adición de muestra va seguida de la adición

de anticuerpo marcado. La detección visual del anticuerpo marcado proporciona una indicación de la presencia de analito de antígeno diana en la muestra.

El documento Korom et al., EP-A 0 299 359, describe una variación en el dispositivo de flujo continuo en el que el anticuerpo marcado se incorpora a una membrana que actúa como un sistema de suministro de reactivo.

- 5 El documento de la técnica anterior US 2003/143639 describe un dispositivo analítico que comprende un conjunto de pieza porosa que consta de una pieza porosa receptora de reactivo líquido, una pieza etiquetada que retiene la sustancia, una pieza de prueba que comprende un sitio de detección y un sitio de referencia, y una pieza de material poroso que absorbe la muestra; y una pieza de material poroso receptora de muestras dispuesta independientemente de la misma y comunicada parcialmente con ella a través de una conexión. Según los autores, el dispositivo analítico de la presente invención exhibe una sensibilidad extremadamente alta y puede realizar con precisión varios tipos de análisis.

El requisito de múltiples etapas de adición y lavado con dispositivos de inmunoensayo de flujo continuo y tira reactiva aumenta la probabilidad de que el personal mínimamente capacitado y los usuarios domésticos obtengan resultados de ensayo erróneos.

- 15 En los ensayos de tipo de migración, se impregna una membrana con los reactivos necesarios para realizar el ensayo. Se proporciona una zona de detección de analito en la que se une el analito marcado y se leen las indicaciones del ensayo. Véase, por ejemplo, Tom et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,366,241, y Zuk, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,596,275. Sin embargo, la sensibilidad de los ensayos de tipo de migración se reduce con frecuencia por la presencia o formación en la muestra de componentes sólidos indeseables que bloquean el paso del analito marcado a la zona de detección. La sensibilidad del ensayo también disminuye cuando los dispositivos de ensayo de migración se inundan con demasiada muestra líquida.

- 25 Los dispositivos de ensayo de migración normalmente incorporan en su interior reactivos que se han adherido a etiquetas coloreadas (esto es, conjugados), lo que permite la detección visible de los resultados del ensayo sin adición de sustancias adicionales. Véase, por ejemplo, Bernstein, Patente de los Estados Unidos No. 4,770,853. Entre dichos marcadores se encuentran partículas de sol. de oro tales como las descritas por Leuving en la Patente de los Estados Unidos No. 4,313,734, partículas de sol de tinte tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 4,373,932 de Gribnau et al., látex teñido tal como el descrito por May et al., WO 88/08534, y colorantes encapsulados en liposomas por Campbell et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,703,017. Estas etiquetas coloreadas están generalmente limitadas en términos de los métodos de inmovilización que sean apropiados. Además, requieren una cantidad relativamente grande de molécula de ligando y pueden implicar reactivos costosos, lo que aumenta el coste. De este modo, sigue existiendo la necesidad de dispositivos de detección rápida extremadamente fiables pero económicos. También sigue existiendo la necesidad de un ensayo altamente sensible que pueda usar un pequeño volumen de muestra mientras proporciona resultados precisos.

Sumario de la invención

- 35 Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un dispositivo de inmunoensayo de detección rápida.

Otro objeto de la invención es proporcionar dispositivos de inmunoensayo que sean fáciles de usar y proporcionen resultados precisos.

Otro objeto de la invención es proporcionar dispositivos de inmunoensayo que no requieran la migración de analitos a lo largo de la misma ruta que las soluciones reguladoras portadoras de conjugado.

- 40 También es un objeto de la invención proporcionar dispositivos de inmunoensayo de detección rápida que sean de construcción simple.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar dispositivos de inmunoensayo que pueden usar un sistema conjugado seco o líquido.

- 45 Otro objeto de la invención es proporcionar un dispositivo de inmunoensayo altamente sensible que proporcione resultados precisos mientras se usan pequeños volúmenes de muestra.

Otro objeto de la invención es proporcionar dispositivos de inmunoensayo altamente sensibles que sean útiles con diferentes tipos de fluidos corporales.

- 50 De acuerdo con estos objetos, que se discutirán en detalle a continuación, se proporcionan sistemas de dispositivos de inmunoensayo conjugados tanto secos como líquidos. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los sistemas de la invención incluyen celdas de prueba con un primer material sorbente que tiene una primera ubicación para recibir una solución reguladora (en el caso de un sistema conjugado seco) o una solución conjugada (en el caso de un sistema conjugado líquido) con el primer material sorbente que define una primera ruta de flujo horizontal, un segundo material sorbente que tiene una segunda ubicación para recibir una muestra con el segundo material sorbente definiendo una segunda ruta de flujo horizontal distinta de la primera ruta de flujo, y una línea de prueba o sitio de

prueba con antígenos o anticuerpos inmovilizados u otras moléculas de unión a ligandos tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicados en una zona de prueba en una unión del primer y segundo materiales sorbentes. Según la invención, el término "distinto" cuando se usa junto con las palabras "ruta de flujo" o "ruta de migración" debe entenderse que significa "no en comunicación fluida excepto a través de una zona de prueba".

- 5 Cuando la celda de prueba de la invención se proporciona en una carcasa, la carcasa está provista de una primera abertura adyacente a la primera ubicación y una segunda abertura adyacente a la segunda ubicación. Se proporciona una ventana de visualización en la carcasa por encima de la línea de prueba.

- Según la invención, el primer material sorbente y el segundo material sorbente son piezas separadas que se superponen entre sí y la línea de prueba está impresa en uno o ambos materiales sorbentes en la unión. Los sistemas de la invención también incluyen preferiblemente una línea de control o un sitio que se puede ver desde la ventana de visualización.

- Según una realización de la invención, los materiales sorbentes de la invención (y la carcasa en la que se proporcionan los materiales) se disponen en forma de T, donde la primera ubicación para recibir la solución reguladora o conjugada de solución reguladora es ubicada cerca de un extremo de la barra superior de la T, la segunda ubicación para recibir la muestra está ubicada cerca del extremo del tallo de la T, y los materiales sorbentes se superponen entre sí en la intersección. Según otro conjunto de realizaciones de la invención, los materiales sorbentes de la invención (y la carcasa en la que se proporcionan los materiales) toman una forma +, donde la primera ubicación para recibir la solución reguladora o conjugada de solución reguladora se ubica cerca de un extremo de una primera barra, la segunda ubicación para recibir la muestra está ubicada cerca del extremo de un extremo de la segunda barra, y los materiales sorbentes se superponen entre sí en la intersección.

En una realización de la invención, los materiales, espesores y longitudes del primer y segundo materiales sorbentes se eligen para ajustar la sincronización con respecto a la muestra líquida y la solución reguladora líquida que llegan al sitio de prueba.

- En el sistema de conjugado seco de la invención, se proporciona un conjugado seco entre la primera abertura y el sitio de prueba. El conjugado está soportado sobre o dentro del material sorbente de manera que cuando se agrega una solución reguladora en la primera abertura, el material sorbente transporta la solución reguladora al conjugado que luego es transportado por la solución reguladora al sitio de prueba. En el sistema de conjugado líquido de la invención, se proporciona un subsistema de líquido conjugado de solución reguladora y se aplica a la primera abertura. El material sorbente luego transporta el subsistema de conjugado de solución reguladora al sitio de prueba.

- Según un método como se describe en este documento, se proporciona un sistema que incluye una celda de prueba que tiene un primer material sorbente que tiene una primera ubicación para recibir una solución reguladora (en el caso de un sistema conjugado seco) o una solución conjugada (en el caso de un sistema líquido conjugado) con el primer material sorbente definiendo una primera ruta de flujo horizontal, teniendo un segundo material sorbente una segunda ubicación para recibir una muestra con el segundo material sorbente definiendo una segunda ruta de flujo horizontal distinta de la primera ruta de flujo, y una línea de prueba o sitio de prueba con antígenos o anticuerpos inmovilizados u otras moléculas de unión a ligando tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc., localizados en una zona de prueba en una unión del primer y segundo materiales sorbentes. Si se desea, también se proporciona una carcasa que tiene una primera abertura para recibir la solución reguladora o conjugada, una segunda abertura para recibir una muestra y una ventana de visualización por encima de la línea de prueba. Se proporciona una muestra de interés para la segunda apertura o ubicación. Después de una cantidad de tiempo deseada, se agrega un líquido, tal como una solución reguladora, a la primera abertura o ubicación. Si el material sorbente soporta un conjugado (esto es, en un sistema de conjugado seco), el líquido es preferiblemente simplemente una solución reguladora. Si el material sorbente no soporta un conjugado (esto es, en un sistema de conjugado líquido), el líquido es preferiblemente un subsistema de líquido conjugado de solución reguladora. En cualquier caso, después de un tiempo suficiente para permitir que el conjugado migre al sitio de prueba (y al sitio de control si se proporciona), se inspecciona el sitio de prueba (y el sitio de control si se proporciona) para determinar si la muestra es "positiva" o no.

- Se apreciará que el sistema de la invención se puede usar junto con diferentes tipos de muestras tales como sangre, orina, saliva y heces, y se puede usar para probar la presencia de cualquier ligando. Cuando se va a proporcionar sangre, saliva o heces, la sangre, la saliva o las heces se pueden diluir o mezclar con solución reguladora antes de agregarlas a través del segundo orificio. Alternativamente, en algunos casos, la muestra se puede agregar a través del orificio y luego se puede agregar un diluyente a través del mismo orificio.

- El dispositivo de prueba de la invención es ventajoso sobre la técnica anterior porque la celda de prueba de la invención supera los problemas de agregación/aglutinación entre el conjugado y el analito en la muestra, lo cual es un problema significativo en el inmunoensayo cromatográfico tradicional para analitos relativamente grandes tales como bacterias. En particular, en los inmunoensayos cromatográficos tradicionales, el complejo entre las bacterias y el anticuerpo conjugado tiene dificultad para migrar a la línea de prueba y tiende a permanecer en el fondo de la tira reactiva o en la almohadilla. En esta invención, no hay unión compleja entre el analito y el conjugado hasta que la muestra alcanza el sitio de prueba, ya que el analito se aplica por su propia ruta al sitio de prueba mientras el conjugado migra por sí mismo. Como resultado, el sistema de la invención es extremadamente sensible y específico.

Los objetos y ventajas adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica al hacer referencia a la descripción detallada tomada junto con las figuras proporcionadas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista esquemática superior de una primera realización de la invención.

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

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

La figura 2 es una vista esquemática superior de una segunda realización de la invención.

La figura 2A es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 2A-2A de la figura 2.

La figura 3 es una vista en sección transversal de una tercera realización de la invención.

10 La figura 4 es una vista esquemática superior de una cuarta realización de la invención.

La figura 5 es una vista esquemática superior de un dispositivo de prueba descrito en este documento.

La figura 6 es una vista esquemática superior de una sexta realización de la invención.

La figura 7 es una vista esquemática superior de una séptima realización de la invención.

La figura 8 es una vista esquemática superior de una octava realización de la invención.

15 La figura 9 es una vista esquemática superior de una novena realización de la invención.

La figura 10 es una vista esquemática superior de una implementación de la invención que no usa una carcasa.

La figura 11 es una tabla que muestra una comparación de la sensibilidad del dispositivo de prueba de la invención con respecto a un dispositivo de prueba de TB típico de la técnica anterior.

20 La figura 12 incluye dos tablas y una clave, con las tablas que muestran comparaciones de la sensibilidad del dispositivo de prueba de la invención con respecto a los dispositivos de prueba de VIH1 y VIH2 típicos de la técnica anterior.

Las figuras 13A-13G son fotografías/diagramas instructivos compuestos de un producto de casete de prueba de VIH 1/2 según la invención con las figuras 13A-13C que muestra el procedimiento de uso del producto de prueba, y las figuras 13D-13G que muestra diversos resultados posibles.

25 Las figuras 14A-14G son fotografías/diagramas instructivos compuestos de un producto de prueba de tira reactiva de VIH 1/2 según la invención con las figuras 14A-14C que muestra el procedimiento de uso del producto de prueba, y las figuras 14D-14G que muestra diversos resultados posibles.

30 Las figuras 15A-15G son fotografías/diagramas instructivos compuestos de un producto de casete de prueba de cribado/confirmación de VIH1/2 según la invención con las figuras 15A-15C que muestran el procedimiento de uso del producto de cribado/prueba, y las figuras 15D-15G que muestran diversos resultados posibles.

Las figuras 16A-16E son fotografías de los resultados de las pruebas obtenidas en tiras reactivas VIH 1/2 de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

35 Pasando ahora a las figuras 1, 1A y 1B, se proporciona una celda 10 de prueba de dispositivo de inmunoensayo e incluye: una carcasa 20 en forma de T que tiene una pared 21 superior que define los primeros y segundos orificios 24, 26 y una ventana 28; y materiales 30, 32 sorbentes o absorbentes primero y segundo que definen rutas de flujo horizontales perpendiculares en la carcasa. El primer material 30 sorbente incluye al menos dos y preferiblemente tres o cuatro zonas y puede estar hecho de una pluralidad de materiales. Una primera zona 31 (a veces denominada zona de filtro) está ubicada en el primer orificio 24 y se extiende hasta una segunda zona 33 (a veces denominada zona de prueba) que está ubicada en la unión de la "T". La primera zona 31 incluye preferiblemente un filtro 31a, una almohadilla 31b sobre o en la que se deposita e inmoviliza un conjugado 39 que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de colores unidos, y una primera porción de una membrana delgada o material 30 sorbente o absorbente por lo general fabricado de nitrocelulosa con soporte de plástico (no se muestra). La primera zona 31 está adaptada para recibir una solución reguladora, para hacer que la solución reguladora entre en contacto con el conjugado, movilizándolo así el conjugado, y para absorber la solución reguladora portadora del conjugado hacia la segunda zona 33. La segunda zona (de prueba) 33 incluye una segunda porción de la membrana 30 delgada que preferiblemente está impresa con una línea 50 de prueba que tiene antígenos o anticuerpos inmovilizados (dependiendo de si la celda de prueba está diseñada para probar la presencia de anticuerpos o antígenos) en la

membrana como es bien conocido en la técnica. La línea 50 de prueba se puede ver a través de la ventana 28 de plástico transparente proporcionada en la carcasa. Una tercera zona opcional 35 (a veces denominada zona de control) que incluye una tercera porción de la membrana 30 delgada también se puede imprimir con una línea 60 de control que contiene por lo general anticuerpos contra los antígenos conjugados (o en algunos casos anticuerpos que se unirán a los anticuerpos conjugados, o incluso antígenos que se unirán a anticuerpos conjugados) como es bien conocido en la técnica. Cuando se proporciona la tercera zona 35, la ventana 28 se extiende por encima de la línea 60 de control. Si se desea, se puede proporcionar una cuarta zona 37 opcional (a veces denominada una zona de depósito) como depósito de absorbente como también es bien conocido en la técnica. La cuarta zona 37 incluye un papel 31d absorbente relativamente más grueso. Preferiblemente, superpuesta a todas las zonas hay una película o tarjeta 38a de plástico delgada, preferiblemente transparente, que tiene un adhesivo que mantiene los materiales sorbentes en su lugar. La tarjeta 38 se puede cortar con una abertura en el orificio 24 para que no bloquee el acceso de líquido al orificio 24.

El segundo material 32 sorbente también puede estar hecho de una pluralidad de materiales y preferiblemente incluye dos zonas 61, 63. La primera zona 61 (a veces denominada zona de filtro) incluye un filtro o almohadilla 62 y una primera porción de una membrana o material sorbente o absorbente 32 delgada por lo general hecho de nitrocelulosa con un soporte (no mostrado). La primera zona 61 está ubicada en el segundo orificio 26 y se extiende hasta la segunda zona 63. La segunda zona 63 incluye una segunda porción de la membrana 32 delgada que está en contacto con la segunda zona 33 del primer material 30 sorbente. Como se ve en las figuras 1A y 1B, el primer material 30 sorbente se superpone al segundo material 32 sorbente de manera que las membranas están en contacto entre sí (a diferencia de los soportes que entran en contacto con las membranas o entre sí), y de manera que la línea 50 de prueba está ubicada efectivamente entre las membranas. De este modo, se puede usar la línea 50 de prueba se podría imprimir en la segunda zona 63 del segundo material 32 sorbente en lugar de, o además de, la segunda zona 33 del primer material 30 sorbente. Si se desea, una película o tarjeta 38b de plástico delgada que tenga un adhesivo que mantiene en su lugar el segundo material sorbente,

Cuando se usan tiras de nitrocelulosa de tipo estándar con un soporte como primera y segunda membranas, es deseable que las membranas tengan diferentes tamaños de poro. Por ejemplo, y como se explica con más detalle en lo que sigue, si la membrana 31 (para la migración del conjugado) tiene un tamaño de poro de $3\ \mu$ y la membrana 32 (para la migración de la muestra) tiene un tamaño de poro de $15\ \mu$, la muestra aplicada a la membrana 32 tenderá a migrar y permanecer en la membrana 32 de muestra y tenderá a no migrar a la membrana 31 conjugada.

El inmunoensayo de la figura 1 se usa preferiblemente de la siguiente manera. Primero, se proporciona una muestra (no mostrada) que posiblemente contenga anticuerpos (o antígenos) a la segunda abertura u orificio 26 y se le permite migrar a través del segundo material 32 sorbente a su segunda zona 63 que está en contacto con la segunda zona 33 del primer material 30 sorbente. Opcionalmente, después de proporcionar la muestra al orificio 26, se puede agregar al orificio 26 una cantidad preferiblemente medida de líquido, tal como una solución reguladora, para ayudar en la migración de la muestra. Independientemente, la muestra alcanza la línea 50 de prueba que está impresa encima de la segunda zona 33 del primer material sorbente o infundida en ella. Después de una cantidad de tiempo deseada, momento en el cual los anticuerpos (o antígenos) en la muestra (si están presentes) habrán tenido la oportunidad de unirse a los antígenos (o anticuerpos) inmovilizados en la línea 50 de prueba, una cantidad preferiblemente medida de líquido, tal como una solución reguladora (no mostrada) se agrega a la primera abertura 24. Después de otro período de tiempo, suficiente para permitir que el conjugado migre al sitio 50 de prueba (y al sitio 60 de control si se proporciona), el sitio 50 de prueba (y sitio 60 de control si se proporciona) se inspecciona a través de la ventana 28 para determinar si la muestra es "positiva" o no. Por lo general, se obtiene una prueba "positiva" que indica la presencia del anticuerpo (o antígeno) en la muestra cuando tanto el sitio 50 de prueba y el sitio 60 de control muestran líneas de color. Se obtiene una prueba "negativa" que indica la falta de presencia del anticuerpo (o antígeno) en la muestra cuando sólo el sitio 60 de control muestra una línea coloreada.

El método de uso del dispositivo de prueba de la invención se puede acelerar proporcionando a la carcasa una numeración y/o letras para indicar que el orificio 26 es para recibir la muestra (y opcionalmente alguna solución reguladora) y se debe usar primero, y ese orificio 24 es para recibir la solución reguladora y se usará en segundo lugar.

Los expertos en la técnica apreciarán que el inmunoensayo 10 funciona de la siguiente manera. Debido a que la línea 50 de prueba está provista de antígenos (o anticuerpos) inmovilizados en una membrana, si la muestra de prueba contiene anticuerpos contra los antígenos (o antígenos contra los anticuerpos), los anticuerpos (o antígenos) se unirán a los antígenos (o anticuerpos) en la línea de prueba. A partir de entonces, cuando el conjugado 39 que contiene un antígeno para el anticuerpo (o anticuerpo para el antígeno) acoplado a un marcador de color se hace migrar a la línea de prueba, si la muestra de prueba contiene los anticuerpos (o antígenos) que ahora se mantienen en la línea 50 de prueba, el antígeno (o anticuerpo) del conjugado se unirá a los anticuerpos (o antígenos) y el marcador de color hará que aparezca una línea coloreada en el sitio 50 de prueba. Si la muestra de prueba no contiene anticuerpos (o antígenos), el conjugado no tendrá los anticuerpos (antígenos) para unirse en la línea 50 de prueba, y no aparecerá ninguna línea coloreada en el sitio 50 de prueba. Por otro lado, debido a que la línea 60 de control está provista de anticuerpos (o antígenos), los antígenos (o anticuerpos) del conjugado siempre se unirán a los anticuerpos (o antígenos) en la línea 60 de control, lo que provocará que aparezca una línea coloreada en el sitio 60 de control si el

conjugado alcanza el sitio 60 de control. De este modo, si se proporciona suficiente solución reguladora a la celda de prueba, siempre debe aparecer una línea coloreada en el sitio 60 de control, proporcionando así un control para la prueba.

Pasando ahora a la figura 2 y la figura 2A, se ve una segunda realización de la invención. En las figuras 1, 1A, 1B, 2 y 2A, los números similares se usan para elementos similares. De este modo, se apreciará que la principal diferencia entre la segunda realización de las figuras 2 y 2A y la primera realización de las figuras 1, 1A y 1B es que el segundo material 32a sorbente de la celda 10a de prueba tiene forma de llave (preferiblemente mediante perforación). Con la disposición en forma de llave, la zona 61a tiene una forma que converge con la segunda zona 63a estrecha. Como resultado, la zona 63a toca la segunda zona 33 del primer material 30 sorbente casi exclusivamente en la ubicación de la línea 50 de prueba. Los expertos en la técnica apreciarán que la celda 10a de prueba de inmunoensayo de la figura 2 se puede usar de la misma manera y funciona sustancialmente igual que la celda 10 de prueba de la figura 1.

Pasando ahora a la figura 3, se ve una tercera realización de la invención. En las figuras 1, 1A, 1B y 3, los números similares se usan para elementos similares. De este modo, se apreciará que la diferencia principal entre la celda 10b de prueba de la tercera realización de la figura 3 y la celda 10 de prueba de la primera realización de las figuras 1, 1A y 1B es que superpuesta a la segunda tira 32 de nitrocelulosa en la ubicación donde la primera tira 30 de nitrocelulosa contacta con la segunda tira (excepto por una zona estrecha en el sitio 50 de prueba adyacente) hay una capa muy delgada de material 99 no poroso tal como el plástico. Como resultado del material 99, las tiras 30 y 32 contactan entre sí casi exclusivamente en la ubicación de la línea 50 de prueba. Los expertos en la técnica apreciarán que la celda 10b de prueba de inmunoensayo de la figura 3 se puede usar de la misma manera y funciona sustancialmente igual que la celda 10 de prueba de la figura 1.

Pasando ahora a la figura 4, se muestra una cuarta realización del dispositivo de inmunoensayo con una celda 10' de prueba (ligeramente modificada con respecto a la celda 10 de prueba de la figura 1) proporcionada que incluye: una carcasa 20' en forma de T que tiene una pared 21' superior que define los primeros y segundos orificios 24', 26' y una ventana 28'; y primer y segundo materiales sorbentes o absorbentes 30', 32' que definen rutas de flujo horizontales perpendiculares en la carcasa. El primer material 30' sorbente incluye al menos dos y preferiblemente tres o cuatro zonas y puede estar hecho de una pluralidad de materiales. Una primera zona 31' (a veces denominada zona de filtro) está ubicada en el primer agujero 24' y se extiende a una segunda zona 33' (a veces denominada zona de prueba) que está ubicada en la unión de la "T". La primera zona 31' incluye preferiblemente un filtro, una almohadilla sobre o en la que se deposita e inmoviliza un conjugado 39' que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de colores unidos, y una membrana delgada por lo general hecha de nitrocelulosa (que se extiende hasta la segunda y opcional tercera y cuarta zonas) con soporte. La primera zona 31' está adaptada para recibir una solución reguladora, para hacer que la solución reguladora entre en contacto con el conjugado, movilizándolo así el conjugado, y para absorber la solución reguladora portadora del conjugado hacia la segunda zona 33'. La segunda zona 33' tiene impresa en la misma una línea 50' de prueba que, como se explica en lo que sigue, se ubica debajo del segundo material 32' sorbente. Se puede proporcionar una tercera zona 35' opcional (a veces denominada zona de control) con una línea 60' de control que por lo general contiene anticuerpos contra los antígenos conjugados (o en algunos casos anticuerpos que se unirán a los anticuerpos conjugados, o incluso antígenos que se unirán a anticuerpos del conjugado) como es bien conocido en la técnica. Donde se proporciona la tercera zona 35', la ventana 28' se extiende por encima de la línea 60' de control. Si se desea, se puede proporcionar una cuarta zona 37' opcional (a veces denominada zona de depósito) como depósito de absorbente, como también es bien conocido en la técnica. La cuarta zona 37' incluye un papel absorbente relativamente más grueso. Preferiblemente, debajo de las cuatro zonas hay una película de plástico delgada que tiene un adhesivo que mantiene los materiales sorbentes en su lugar.

El segundo material 32' sorbente también puede estar hecho de una pluralidad de materiales y preferiblemente incluye dos zonas 61', 63'. La primera zona 61' (a veces denominada zona de filtro) está ubicada en el segundo orificio 26' y se extiende hasta la segunda zona 63' que está en contacto con la segunda zona 33' del primer material 30' sorbente. Si se desea, la segunda zona 63' del segundo material 32' sorbente se puede imprimir con la línea 50' de prueba que tiene antígenos o anticuerpos inmovilizados (dependiendo de si la celda de prueba está diseñada para probar la presencia de anticuerpos o antígenos) como está bien conocido en la técnica. Independientemente de si la segunda zona 63' o la segunda zona 33' o ambas están provistas de la línea 50' de prueba, la línea 50' de prueba se puede ver a través de la ventana 28' de plástico transparente provisto en la carcasa. Como sugieren las líneas en la figura 4 (comparar con la figura 1), el segundo material 32' sorbente se superpone al primer material 30' sorbente, de modo que las membranas delgadas de ambos materiales están en contacto entre sí al menos en la ubicación de la línea de prueba. El segundo material 32' sorbente puede tener la forma de la figura 1, de modo que se proporcione una tira de nitrocelulosa estándar con soporte. Alternativamente, el material 32' puede tener la forma de la figura 2 de manera que toque el primer material sorbente casi exclusivamente en la ubicación de la línea 50' de prueba. Como otra alternativa, el material 32' puede tener la forma de la figura 1, y se puede proporcionar una membrana delgada no porosa como en la figura 3 de manera que los materiales 30' y 32' se toquen entre sí casi exclusivamente en la ubicación de la línea 50' de prueba.

Los expertos en la técnica apreciarán que la celda 10' de prueba de inmunoensayo de la figura 4 se puede usar de la misma manera y funciona sustancialmente igual que la celda 10 de prueba de la figura 1.

Pasando ahora a la figura 5, se proporciona una celda 10" de prueba de dispositivo de inmunoensayo e incluye: una carcasa 20" en forma de T que tiene una pared 21" superior que define los primeros y segundos orificios 24", 26" y una ventana 28"; y un material 30" sorbente o absorbente en forma de T que define rutas de flujo perpendiculares en la carcasa. El material 30" sorbente en forma de T incluye al menos tres y preferiblemente cuatro o cinco zonas y puede estar hecho de una pluralidad de materiales. Una primera zona 31" (a veces denominada zona de filtro) está ubicada en el primer orificio 24" y se extiende a una segunda zona 33" (a veces denominada zona de prueba) que está ubicada en el cruce de la "T". La primera zona 31" incluye preferiblemente un filtro, una almohadilla sobre o en la que se deposita e inmoviliza un conjugado 39" que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de colores unidos, y una membrana delgada por lo general hecha de nitrocelulosa y un soporte para la misma. La primera zona 31" está adaptada para recibir una solución reguladora, para hacer que la solución reguladora entre en contacto con el conjugado, movilizándolo así el conjugado, y para absorber la solución reguladora que lleva el conjugado a la segunda zona 33". La segunda zona (de prueba) 33" se imprime preferiblemente con una línea 50" de prueba que tiene antígenos o anticuerpos inmovilizados (dependiendo de si la célula de prueba está diseñada para probar la presencia de anticuerpos o antígenos) en la membrana como es bien conocida en la técnica. La línea 50" de prueba se puede ver a través de la ventana de 28" de plástico transparente provisto en la carcasa. La tercera zona 61" (a veces también llamada zona de filtro) está ubicada en el segundo orificio 26", es perpendicular a la tira definida por la primera y la segunda zona, y se extiende hasta la segunda zona 33". Una cuarta zona 35" opcional (a veces denominada zona de control) también se puede imprimir con una línea 60" de control de que por lo general contiene anticuerpos contra los antígenos conjugados (o en algunos casos, anticuerpos que se unirán a los anticuerpos conjugados, o incluso antígenos que se unirán a los anticuerpos conjugados) como se conoce en la técnica. Cuando se proporciona la cuarta zona 35", la ventana 28" se extiende por encima de la línea 60" de control. Si se desea, se puede proporcionar una quinta zona 37" opcional (a veces denominada zona de depósito) como depósito de absorbente, como también es bien conocido en la técnica. La quinta zona 37" incluye un papel absorbente relativamente más grueso. Preferiblemente, debajo de todas las zonas hay una película de plástico delgada que tiene un adhesivo que mantiene los materiales sorbentes en su lugar.

El dispositivo de prueba descrito en la figura 5 difiere de las realizaciones de las figuras 1-4 solo en que en lugar de usar dos tiras de material separadas que se superponen entre sí en la zona de prueba, se usa una sola membrana en forma de T que define una primera tira horizontal con zonas 31", 33" y preferiblemente 35" y 37", y una segunda tira (integral) con la zona 61" que toca la primera tira en la zona de prueba 33". Si bien la figura 5 no permite que las rutas de flujo horizontal se adapten con materiales de diferentes tamaños de poros, se mantienen dos rutas de migración distintas ya que la primera y la tercera zonas no están en comunicación fluida entre sí, excepto a través de la segunda zona (de prueba).

Pasando ahora a la figura 6, se proporciona una celda de prueba de dispositivo de inmunoensayo 110 e incluye: una carcasa 120 en forma de + que tiene una pared 121 superior que define los primeros y segundos orificios 124, 126 y una ventana 128; y un primer y segundo materiales 130, 132 sorbentes o absorbentes que definen rutas de flujo perpendiculares en la carcasa. El primer material 130 sorbente incluye al menos dos y preferiblemente tres o cuatro zonas y puede estar hecho de una pluralidad de materiales. Una primera zona 131 (a veces denominada zona de filtro) está ubicada en el primer orificio 124 y se extiende hasta una segunda zona 133 (a veces denominada zona de prueba) que está ubicada en la unión del "+". La primera zona 131 incluye preferiblemente un filtro, una almohadilla sobre o en la que se deposita e inmoviliza un conjugado 139 que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de colores unidos, y una membrana delgada por lo general hecha de nitrocelulosa. La primera zona 131 está adaptada para recibir una solución reguladora, para hacer que la solución reguladora entre en contacto con el conjugado, movilizándolo así el conjugado, y para absorber la solución reguladora portadora de conjugado hacia la segunda zona 133. La segunda zona (de prueba) 133 es preferiblemente impresa con una línea 150 de prueba que tiene antígenos o anticuerpos inmovilizados (dependiendo de si la célula de prueba está diseñada para probar la presencia de anticuerpos o antígenos) en la membrana como es bien conocida en la técnica. La línea 150 de prueba se puede ver a través de la ventana 128 de plástico transparente proporcionada en la carcasa. También se puede imprimir una tercera zona opcional 135 (a veces denominada zona de control) con una línea 160 de control que por lo general contiene anticuerpos contra los antígenos conjugados (o en algunos casos anticuerpos que se unirán a los anticuerpos conjugados, o incluso antígenos que se unirán a los anticuerpos conjugados) como es bien conocido en la técnica. Cuando se proporciona la tercera zona 135, la ventana 128 se extiende por encima de la línea 160 de control. Si se desea, se puede proporcionar una cuarta zona 137 opcional (a veces denominada zona de depósito) como depósito de absorbente como también es bien conocida en la técnica. La cuarta zona 137 incluye un papel absorbente relativamente más grueso. Preferiblemente, superpuesta a las zonas (de una manera tal como la que se ve en la figura 1A) hay una película de plástico delgada que tiene un adhesivo que mantiene los materiales sorbentes en su lugar.

El segundo material 132 sorbente también puede estar hecho de una pluralidad de materiales y preferiblemente incluye al menos tres zonas 161, 163, 165. La primera zona 161 (a veces denominada zona de filtro) está ubicada en el segundo orificio 126 y se extiende a la segunda zona 163 que está en contacto con la segunda zona 133 del primer material 130 sorbente. Si se desea, el material 132 sorbente se puede imprimir con la línea 150 de prueba en la segunda zona 163 en lugar de o además de la segunda zona 133 de material 130. Como se sugiere por las líneas de puntos en la figura 6, el primer material 130 sorbente se superpone al segundo material 132 sorbente (como en la realización de la figura 1). Alternativamente, el segundo material 132 sorbente se puede hacer para superponerse al

primer material 130 sorbente (como en la realización de la figura 4), en cuyo caso las películas adhesivas donde se usan, y otros elementos deben disponerse correctamente. Si se desea, se puede proporcionar una tercera zona 165 opcional (a veces denominada zona de depósito) como depósito de absorbente. La cuarta zona 137 incluye un papel absorbente relativamente más grueso. Si se desea, se puede usar una película de plástico delgada que tenga un adhesivo que mantenga en su lugar el segundo material sorbente.

En la figura 7, se ve otra realización de la invención. En las figuras 1, 1A, 1B y 7, los números similares se usan para elementos similares. De este modo, se apreciará que la diferencia principal entre la realización de la figura 7 y la primera realización de las figuras 1, 1A y 1B es que dos líneas 50A y 50B de prueba están impresas en la zona 33 del primer material 30 sorbente y/o en la zona 63 del segundo material 32 sorbente. Las dos líneas 50A y 50B de prueba incluyen preferiblemente diferentes antígenos o anticuerpos inmovilizados. Por ejemplo, una de las líneas (por ejemplo, la línea 50A) podría incluir péptidos del VIH1 y/o antígenos recombinantes como gp41/gp120, mientras que la otra línea (por ejemplo, la línea 50B) podría incluir péptidos del VIH2 y/o antígenos recombinantes tales como gp36. Como otro ejemplo, una de las líneas podría incluir péptidos y/o antígenos recombinantes de VIH1, VIH2 o VIH1/2, mientras que la otra línea incluye antígenos de tuberculosis. Como se analiza a continuación, cuando las líneas de prueba incluyen anticuerpos o antígenos inmovilizados que no se unirán a un solo conjugado (tales como la proteína A), puede ser deseable usar una pluralidad de conjugados diferentes que tengan los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de colores unidos. Los expertos en la técnica apreciarán que la celda de prueba de inmunoensayo 10c de la figura 7 se puede usar de la misma manera y funciona sustancialmente igual que la celda 10 de prueba de la figura 1, excepto que una prueba "positiva" indica la presencia de se obtiene un primer anticuerpo (o antígeno) que se está probando en la muestra cuando la línea 50A de prueba y el sitio 60 de control muestran líneas de color; se obtiene una prueba "positiva" que indica la presencia de un segundo anticuerpo (o antígeno) que se está probando en la muestra cuando la línea 50B de prueba y el sitio 60 de control muestran líneas de color; y se obtiene una prueba "positiva" que indica la presencia tanto del primer como del segundo anticuerpos (o antígenos) que se están probando en la muestra cuando las líneas 50A y 50B de prueba y el sitio 60 de control muestran líneas de color. Se obtiene una prueba "negativa" que indica la falta de presencia del anticuerpo (o antígeno) en la muestra cuando sólo el sitio 60 de control (y ninguna de las líneas 50A y 50B de prueba) muestra una línea coloreada. Se obtiene una prueba no válida cuando el sitio de control no muestra una línea de color.

En la figura 8, se ve otra realización de la invención. En las figuras 1, 1A, 1B y 8, los números similares se usan para elementos similares. De este modo, se apreciará que las principales diferencias entre la realización de la figura 8 y la primera realización de las figuras 1, 1A y 1B es que se imprimen tres líneas 50A, 50B, 50C de prueba en la zona 33 del primer material 30 sorbente y/o en la zona 63 del segundo material 32 sorbente, y que se usan dos conjugados 39A, 39B de látex diferentes. Las tres líneas 50A, 50B y 50C de prueba incluyen preferiblemente diferentes antígenos o anticuerpos inmovilizados. Por ejemplo, una de las líneas (por ejemplo, la línea 50A) podría incluir anticuerpos monoclonales p24, una segunda línea (por ejemplo, la línea 50B) podría incluir péptidos del VIH1 y/o antígenos recombinantes tales como gp41/gp120, mientras que la tercera línea (por ejemplo, línea 50C) podría incluir péptidos de VIH2 y/o antígenos recombinantes tales como gp36. En este caso, se proporcionan dos conjugados 39A, 39B, siendo el conjugado 39A un conjugado de látex con proteína A que se unirá a los anticuerpos del VIH1 y VIH2, si están presentes, pero no se unirá al antígeno p24, y el conjugado 39B es un conjugado de látex para p24 monoclonal que se unirá al antígeno p24 en la muestra, si está presente, pero que no se unirá a los péptidos y/o antígenos recombinantes del VIH1 y VIH2. Como se muestra en la figura 8, los conjugados 39A y 39B están ubicados en diferentes ubicaciones de la ruta de migración (por ejemplo, en dos porciones de una sola almohadilla o en dos almohadillas conectadas). Sin embargo, se apreciará que los conjugados 39A y 39B se pueden aplicar en el mismo lugar como una mezcla. Los expertos en la técnica apreciarán que la celda 10d de prueba de inmunoensayo de la figura 8 se puede usar de la misma manera y funciona sustancialmente igual que la celda 10 de prueba de la figura 1, excepto que se indica una prueba "positiva" para el VIH. por la visibilidad del color en una o más de las líneas 50A, 50B, 50C y en la línea 60 de control, una prueba "negativa" se indica mediante la visibilidad del color en la línea 60 de control solamente, y una prueba "no válida" se indica cuando no aparece ningún color en la línea 69 de control.

Otra realización de la invención se ve en la figura 9. En las figuras 1, 1A, 1B y 9, los números similares se usan para elementos similares. De este modo, se apreciará que la diferencia principal entre la realización de la figura 9 y la primera realización de las figuras 1, 1A y 1B es que el segundo material 32" sorbente incluye una primera zona 61" (a veces denominada zona de filtro) que tiene un filtro o almohadilla 62" que tiene un conjugado 39" de un anticuerpo unido a un agente aglutinante intermedio (sin marcador), y la zona de prueba tiene una línea 50 de prueba de un agente aglutinante inmovilizado. El agente de unión intermedio y el agente de unión inmovilizado se eligen por su capacidad para unirse selectivamente muy bien entre sí. De este modo, por ejemplo, el agente de unión intermedio puede ser biotina y el agente de unión inmovilizado puede ser estreptavidina. Por lo tanto, el conjugado 39" en la ruta de migración de la muestra puede ser un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal p24 que está unido a la biotina. Asimismo, el conjugado 39 en la ruta de migración de la solución reguladora es preferiblemente un marcador de látex conjugado con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se unirá al antígeno de interés.

Con la celda 10e de prueba de la figura 9 que está dispuesta para detectar un virus p24, primero se agrega una muestra al segundo material 32" sorbente. Cuando la muestra alcanza el anticuerpo monoclonal p24 - conjugado 39" de biotina, el antígeno p24 (virus), si está presente en la muestra, se unirá al anticuerpo monoclonal p24 - conjugado de biotina y migrará al área de prueba 63" de la tira 32" donde la biotina será capturada por la estreptavidina en la

línea 50 de prueba ubicada en la tira 32" y/o en la tira 31. De este modo, la línea 50 de prueba tendrá un complejo de estreptavidina unido a biotina que está unido a un anticuerpo monoclonal p24 que a su vez está unido a un antígeno p24. La solución reguladora luego se agrega al primer material 31 sorbente. La solución reguladora lleva el marcador de látex - conjugado 39 del anticuerpo monoclonal al área 33 de prueba donde el anticuerpo monoclonal del conjugado 39 se une al antígeno p24 contenido en el complejo ya presente, presentando así una línea coloreada debido al marcador. Si no hay antígeno presente en la muestra, el conjugado 39" de biotina-anticuerpo monoclonal p24 todavía se unirá a la estreptavidina, dejando un complejo de estreptavidina, biotina y anticuerpo monoclonal p24 en la línea de prueba. Sin embargo, cuando el conjugado 39 de anticuerpo monoclonal marcador de látex llega al área de prueba, el anticuerpo monoclonal no tendrá antígeno al que unirse. De este modo, no se mantendrá ningún conjugado 39 marcador en la línea 50 de prueba, y se registrará una prueba "negativa".

Los expertos en la técnica apreciarán que el sistema de la figura 9 proporciona una ventaja importante sobre los sistemas de flujo lateral tradicionales de la técnica debido a la alta afinidad del agente aglutinante intermedio (por ejemplo, biotina) y el agente aglutinante inmovilizado (por ejemplo, estreptavidina) que da como resultado una prueba extremadamente sensible.

Pasando ahora a la figura 10, se proporciona un kit 200 de prueba de inmunoensayo e incluye una lanceta 201, un paquete 202 de solución reguladora, un bucle 203, una toallita 204 con alcohol, una venda 205 adhesiva y un dispositivo de prueba o celda 210 de prueba. La celda 210 de prueba es similar a las celdas de prueba de las otras realizaciones, con ciertas excepciones, tales como un soporte 215 de cartón que se proporciona en lugar de una carcasa, y las cubiertas 217a, 217b, 217c de papel que se proporcionan sobre diversas porciones de los materiales sorbentes. Preferiblemente, se proporcionan marcas de flecha para indicar en qué dirección tirar de las cubiertas 217a, 217b de papel para retirarlas de los materiales sorbentes. Más particularmente, la celda 210 de prueba incluye un primer y segundo materiales 230, 232 sorbentes o absorbentes que definen rutas de flujo horizontales perpendiculares. El primer material 230 sorbente incluye al menos dos y preferiblemente tres o cuatro zonas y puede estar hecho de una pluralidad de materiales. Una primera zona 231 (a veces denominada zona de filtro) está ubicada en un extremo del primer material sorbente y se extiende a una segunda zona 233 (a veces denominada zona de prueba) que está ubicada en la unión de la "T". La primera zona 231 incluye preferiblemente un filtro, una almohadilla sobre o en la que se deposita e inmoviliza un conjugado 239 que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de colores unidos, y una primera porción de una membrana delgada o material 230 sorbente o absorbente por lo general hecho de nitrocelulosa con soporte de plástico (no se muestra). La primera zona 231 está adaptada para recibir una solución reguladora, para hacer que la solución reguladora entre en contacto con el conjugado, movilizándolo así el conjugado, y para absorber la solución reguladora portadora del conjugado hacia la segunda zona 233. Al menos una porción de la primera zona por lo general está cubierta por una cubierta 217a de papel. La segunda zona (de prueba) 233 incluye una segunda porción de la membrana 230 delgada que preferiblemente está impresa con una o más líneas de prueba (se muestra una) 250 que tienen antígenos o anticuerpos inmovilizados (por ejemplo, péptidos gp41/gp120 y gp36 para la detección de VIH1/2) sobre la membrana como es bien conocido en la técnica. El material sorbente en la línea 250 de prueba se puede descubrir o cubrir con una cubierta de plástico transparente (no mostrada). Una tercera zona 235 opcional (a veces denominada zona de control) que incluye una tercera porción de la membrana 230 delgada también se puede imprimir con una línea 260 de control que por lo general contiene anticuerpos contra los antígenos conjugados (o en algunos casos anticuerpos que se unirán a los anticuerpos conjugados, o incluso antígenos que se unirán a anticuerpos conjugados) como es bien conocido en la técnica. La tercera zona también se puede dejar al descubierto o cubrirse con una cubierta de plástico transparente. Si se desea, se puede proporcionar una cuarta zona 237 opcional (a veces denominada zona de depósito) como depósito de absorbente como también es bien conocido en la técnica. La cuarta zona 237 incluye un papel absorbente relativamente más grueso y puede estar cubierta por la cubierta 217b. Preferiblemente, debajo de las zonas 231, 235 y 237 hay una tira adhesiva delgada (no mostrada) que mantiene los materiales sorbentes en su lugar. La tira adhesiva se coloca encima del cartón 215.

El segundo material 232 sorbente también puede estar hecho de una pluralidad de materiales y preferiblemente incluye dos zonas 261, 263. La primera zona 261 (a veces denominada zona de filtro) incluye un filtro o almohadilla 262 y una primera porción de una delgada membrana o material 232 sorbente o absorbente por lo general hecho de nitrocelulosa con un soporte (no mostrado). La primera zona 261 se extiende hasta la segunda zona 263. Al menos una porción de la primera zona está cubierta por lo general por una cubierta 217c de papel. La segunda zona 263 incluye una segunda porción de la membrana 232 delgada que está en contacto con la segunda zona 233 del primer material 230 sorbente. El segundo material 232 sorbente subyace al primer material 230 sorbente de manera que las membranas están en contacto entre sí y de manera que la línea 250 de prueba esté ubicada efectivamente entre las membranas. De este modo, la línea 250 de prueba se podría imprimir en la segunda zona 263 del segundo material 232 sorbente en lugar de, o además de, la segunda zona 233 del primer material 230 sorbente. Preferiblemente, las zonas 261 y 263 subyacentes es una tira adhesiva delgada (no mostrado) que mantiene el segundo material sorbente en su lugar. La tira adhesiva se coloca encima del cartón 215.

Se apreciará que el dispositivo 210 de prueba de la figura 10 se puede modificar para asumir cualquiera de las configuraciones de las realizaciones descritas anteriormente.

Un usuario usa el kit de prueba de la figura 10 abriendo un blíster (no mostrado) que contiene todos los elementos del kit, quitando una cubierta de papel (si se proporciona) del dispositivo 210 de prueba, abriendo el paquete de toallitas

con alcohol y limpiando su dedo con la toallita 204 con alcohol, tomando la lanceta 201 y pinchando su dedo limpiado para sacar sangre. Luego, usando preferiblemente el bucle 203, el usuario recoge una gota de sangre (por ejemplo, 5 microlitros) y coloca la gota de sangre en la porción no cubierta de la zona 261 del segundo material 232 sorbente. El usuario puede entonces abrir el paquete de vendaje adhesivo y coloque el vendaje 205 adhesivo sobre el dedo pinchado. A continuación, el usuario abre el paquete 202 de solución reguladora y exprime una gota (por ejemplo, 30 microlitros) de solución reguladora en la misma ubicación que la sangre en la zona 261. Después de esperar una cantidad de tiempo deseable (por ejemplo, 5 minutos) para que la sangre migre a la zona 263 de prueba, el usuario agrega dos gotas (por ejemplo, 60 microlitros) de solución reguladora a la primera zona 231 del primer material 230 sorbente. Después de esperar una cantidad de tiempo deseable (por ejemplo, 7 minutos) después de que se agregó la solución reguladora a la zona 231, se visualizan la línea 250 de prueba y la línea 260 de control. Una prueba "positiva" se indica por la aparición de color tanto en la línea 250 de prueba como en la línea 260 de control. Una prueba "negativa" se indica por la aparición de color en la línea 260 de control y sin color en la línea 250 de prueba. Si no aparece ningún color en la línea 260 de control, los resultados de la prueba no son válidos.

Según otras realizaciones de la invención, en lugar de proporcionar un depósito de conjugado seco que tiene los antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de colores unidos en la celda de prueba, la celda de prueba no incluye un conjugado seco en absoluto. Por el contrario, se usa un subsistema de solución reguladora-conjugado (húmedo) y no se requiere la almohadilla de conjugado (31b - figura 1A) de modo que la tira delgada de nitrocelulosa u otro material sorbente se pueda acoplar directamente al filtro (31a - figura 1A). De este modo, después de que la muestra se haya depositado en el segundo orificio en la carcasa y se le haya permitido migrar al sitio de prueba, el subsistema de solución reguladora-conjugado se deposita en el primer orificio en la carcasa y también se le permite migrar al sitio de prueba.

Según otras realizaciones de la invención, en lugar de que se proporcione la ventana de visualización en la parte superior de la carcasa, se proporciona una ventana en la parte inferior de la carcasa.

Los expertos en la técnica apreciarán que las realizaciones de la invención se pueden realizar usando muchos materiales diferentes. Por ejemplo, el (los) material (s) sorbente (s), que por lo general incluyen una película inerte, tira, hoja o membrana muy delgada, pueden estar formados a partir de nitrocelulosa, papel de filtro, sílice o, por ejemplo, de tejidos microporosos o microgranulares tejidos o no tejidos o combinaciones de los mismos. En la Patente de los Estados Unidos No. 4,960,691 de Gordon et al. y la Patente de los Estados Unidos No. 4,956,275 de Zuk et al., se describen muchos tipos de materiales apropiados y combinaciones de los mismos. A menudo, la nitrocelulosa u otros materiales sorbentes se proporcionarán con un soporte de plástico inerte no poroso delgado como se describió anteriormente.

De este modo, de acuerdo con realizaciones adicionales de la invención, los materiales, espesores y longitudes del primer y segundo materiales sorbentes se eligen para ajustar el tiempo con respecto a la muestra líquida y la solución reguladora líquida (o subsistema conjugado de solución reguladora) que llegan al sitio de prueba. Al proporcionar rutas de migración separadas para la muestra/analito y el subsistema de solución reguladora o de solución reguladora-conjugado, los materiales también se pueden elegir para mejorar la sensibilidad del sistema.

De este modo, para ayudar a acelerar la absorción, el material sorbente puede tener forma de llave con la tira con un ancho menor en el primer orificio que recibe la solución reguladora y en el sitio de prueba y el sitio de control, y un ancho más ancho en una zona de depósito. Dicha disposición se muestra en la Patente de los Estados Unidos No. 5,989,921 de Charlton et al. En cualquier caso, generalmente, la tira reactiva será sustancialmente mayor en longitud que en ancho, y sustancialmente mayor en ancho que en grosor. De hecho, en al menos ciertas realizaciones de la presente invención, la tira en la zona de prueba debe ser fina como el papel (por ejemplo, 0.1 mm de grosor) y suficientemente translúcida para que las líneas de prueba y control puedan verse fácilmente a través de la tira reactiva.

Además, la carcasa y el material sorbente se pueden integrar en una plataforma de flujo lateral abierta donde el polímero moldeado por inyección está provisto de micropilares que permiten un control exacto del flujo variando la altura, el diámetro, la forma y/o la distancia entre los pilares. Dicha plataforma usa esencialmente el mismo material para la carcasa y el material sorbente absorbente y es vendida por Amic AB de Uppsala, Suecia. Véase, por ejemplo, www.amic.se. Dado que el polímero moldeado por inyección puede ser generalmente transparente, toda la carcasa puede considerarse la "ventana" a través de la cual se pueden ver las líneas/sitios de prueba y control.

También se apreciará que dependiendo del tipo de prueba que se esté construyendo (por ejemplo, embarazo, VIH, tuberculosis (TB), prión, análisis/arrastré de orina, marcadores cardíacos, marcadores de cáncer, Chagas, clamidia, bacterias dentales (SM/LC), influenza A, influenza B, adenovirus, rotavirus, estreptococo A, otras bacterias o virus, etc., e incluso aplicaciones veterinarias tales como CPV, FIV, FeLV y dirofilariosis), el anticuerpo (o antígeno) de interés será diferente y, por lo tanto, el antígeno (o anticuerpo) usado en la tira reactiva deberá adaptarse de acuerdo con lo anterior. Asimismo, el antígeno o anticuerpo del conjugado deberá adaptarse de acuerdo con lo anterior. En algunos casos (tales como el VIH), el antígeno idéntico se puede usar en la tira reactiva como en el conjugado, ya que el sitio de unión del anticuerpo del VIH se unirá al antígeno del VIH en el sitio de prueba y aún proporcionará sitios de unión adicionales para la unión al antígeno-conjugado, mientras que en otros casos, pueden ser necesarios diferentes antígenos. De manera similar, se apreciará que dependiendo del tipo de prueba que se esté construyendo, el sitio de control, cuando se proporcione, deberá adaptarse de acuerdo con lo anterior. De este modo, por ejemplo, en una

prueba de detección de anticuerpos del VIH, donde el ligando que se identificará en la zona de prueba serán los anticuerpos del VIH 1 y/o VIH2, el antígeno en la zona de prueba puede ser una mezcla de VIH 1 (por ejemplo, gp41/gp120) y péptidos y/o antígenos recombinantes del VIH 2 (gp36). El conjugado puede ser un látex coloreado o un oro coloidal conjugado con proteína A, proteína A/G, IgG/IgM antihumana, péptidos o antígenos recombinantes.

Los expertos en la técnica también apreciarán que el marcador del conjugado puede adoptar muchas formas, incluidos diferentes tipos de soles metálicos, un látex coloreado, cualquiera de diversas enzimas, etc. Aunque la realización preferida de la invención proporciona una señal de detección fácilmente visible a simple vista, se apreciará que la invención abarca otros marcadores que se pueden detectar mediante radiación ultravioleta u otras técnicas tales como la fluoroscopia. De este modo, se apreciará que se puede proporcionar un sistema que emplee las celdas de prueba de la invención que son leídas por un lector automático tal como un lector fluoroscópico o digital.

La presente invención proporciona una sensibilidad mejorada sin comprender la especificidad del ensayo. Las principales razones de la mejora de la sensibilidad son una migración mejorada de la muestra a la zona de prueba debido a la ruta de migración distinta, y la unión eficaz del analito al sitio de unión en la zona de prueba antes de la reacción del conjugado marcador con el complejo de zona de prueba. Por ejemplo, en el caso de una prueba de VIH, los anticuerpos específicos del VIH en las muestras de suero sanguíneo aplicadas a la segunda tira sorbente migrarán a la zona de prueba y se unirán a la(s) línea(s) de prueba de VIH. Ninguna otra inmunoglobulina G (IgG) en la sangre se unirá a los antígenos del VIH inmovilizados en la zona de prueba. Cuando se agrega solución reguladora a la primera tira sorbente para hacer que el conjugado de proteína A con látex u oro migre a la zona de prueba, el conjugado de proteína A se unirá a la parte FC de los anticuerpos del VIH que ya son capturados por los péptidos del VIH en la línea de prueba. Debido a que la unión entre la proteína A y la parte FC de los anticuerpos del VIH es muy fuerte, solo debe estar presente una pequeña cantidad de anticuerpos del VIH para poder ser detectada. Esto contrasta con los sistemas tradicionales de prueba del VIH de flujo lateral, donde toda la IgG humana (incluidos los anticuerpos del VIH) en la muestra de sangre se unirá a la proteína A antes de la migración a la línea de prueba, porque la proteína A se une de manera no específica a toda la IgG. De este modo, todo el complejo de proteína A, IgG, oro/látex migrará a la línea de prueba que contiene los antígenos del VIH. Sólo los anticuerpos del VIH, la proteína A, los conjugados de oro/látex se unirán entonces a los antígenos del VIH. Sin embargo, debido a la gran cantidad de IgG no relacionada en las muestras y la pequeña cantidad de anticuerpos del VIH presentes, existe el riesgo de que no se unan suficientes anticuerpos del VIH a la proteína A, y la línea coloreada no será visible.

La sensibilidad aumentada de la invención se probó comparando los inmunoensayos de TB de la invención ("New Generation") sustancialmente como se muestra en la figura 10 con los inmunoensayos de TB de prueba rápida estándar (TB Stat-Pak II). Se generaron dieciséis muestras, con dos muestras en cada uno de los ocho niveles diferentes de anticuerpos (32 U/ml, 8 U/ml, 2 U/ml, 1 U/ml, 1/2 U/ml, 1/4 U/ml, 1/8 U/ml, y un control de 0 U/ml. Los resultados de la prueba de comparación se ven en la figura 11, mostrando los inmunoensayos de la invención al menos un aumento de ocho veces en la sensibilidad con respecto a las pruebas de la técnica anterior estándar (esto es, se detecta un resultado positivo a 1/4 U/ml para el inmunoensayo de la invención, y se detecta un resultado cuestionable a 2 U/ml para el inmunoensayo de la técnica anterior). Además, veinte pruebas de muestras negativas no mostraron resultados falsos positivos.

La sensibilidad aumentada de la invención también se probó comparando inmunoensayos de VIH1 y VIH2 de la invención ("prueba de NG VIH") sustancialmente como se muestra en la figura 10 con inmunoensayos de VIH de prueba rápida de tipo estándar (VIH Stat-Pak). Se generaron muestras con diferentes niveles de dilución (1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096; 1:8192 para VIH-1, y 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 para VIH-2). Los resultados de las pruebas de comparación se ven en la figura 12, donde los inmunoensayos de la invención indican un aumento de aproximadamente cuatro veces en la sensibilidad con respecto a las pruebas estándar de la técnica anterior (esto es, el resultado positivo más sensible se detecta para VIH1 en la dilución 1:4096 para el inmunoensayo de la invención, y el resultado positivo más sensible se detectó a una dilución 1:1024 para el inmunoensayo de la técnica anterior; y el resultado positivo más sensible se detectó para VIH2 a la dilución 1:512 para el inmunoensayo de la invención, y el resultado positivo más sensible detectado a una dilución 1:128 para el inmunoensayo de la técnica anterior). Además, ciento veinte pruebas de muestras negativas de las pruebas NG VIH mostraron una tasa de falsos positivos de menos del 1 por ciento.

Se cree que los dispositivos de tiras reactivas de inmunoensayo de la invención pueden proporcionar tiempos de ensayo reducidos con respecto a los dispositivos de la técnica anterior. En particular, se sabe que la sangre, las heces o la saliva migrarán muy lentamente en las pruebas de tiras cromatográficas convencionales. Sin embargo, en los dispositivos de tiras reactivas de ensayo de inmunoensayo de la invención, dado que se proporciona una ruta de migración separada para la muestra, el material sorbente usado se puede seleccionar específicamente en relación con la prueba de interés para permitir una migración rápida sin preocupaciones con respecto a la migración del conjugado, y por lo tanto el tiempo de ensayo puede ser muy rápido en relación con la técnica anterior. Por ejemplo, el primer material 30, 30', 30", 130, 230 sorbente puede estar hecho de material que tenga poros relativamente pequeños (a modo de ejemplo y sin limitación, menos de 20 micrómetros, y más preferiblemente de 3 a 15 micrómetros), mientras que el segundo material 32, 32', 132, 232 sorbente puede estar hecho de material que tenga poros relativamente más grandes (a modo de ejemplo y no de limitación, más de 20 micrómetros, y más preferiblemente 25-40 micrómetros). De esta manera, la muestra con el analito podrá migrar más fácilmente por su

ruta, mientras que al mismo tiempo, se proporciona una línea de tira reactiva altamente sensible en el primer material sorbente de poros relativamente pequeños. Además, como se mencionó anteriormente, al proporcionar el segundo material sorbente con un tamaño de poro que es mayor que el tamaño de poro del primer material sorbente, la migración de la muestra desde el segundo material sorbente al primer material sorbente es deseablemente limitada.

5 Los ejemplos de tiras sorbentes (membranas) que tienen poros relativamente más pequeños incluyen MDI-08 (8 micrómetros), MDI-10 (10 micrómetros), MDI-15 (15 micrómetros) de Advanced Microdevice of Ambala, India, y SP (3 micrómetros), FP (5 micrómetros) y RP (8 micrómetros) de Whatman, Inc., de Floral Park, Nueva Jersey. Un ejemplo de una tira sorbente que tiene poros relativamente más grandes es P40 (30 micrómetros) de Schleicher & Schuell Bioscience, Inc. de Keene, New Hampshire.

10 Además, se cree que la migración de partículas conjugadas en ausencia de la muestra proporciona una migración más uniforme y consistente, lo que da como resultado una mejora del aclaramiento de fondo.

Otra ventaja de los dispositivos de tiras reactivas de inmunoensayo de la invención es que superan los problemas de agregación/aglutinación entre el conjugado marcador y el analito en la muestra, lo que constituye un problema importante para los analitos grandes (tales como bacterias) en los inmunoensayos cromatográficos tradicionales. En la técnica anterior, el gran complejo entre bacterias y anticuerpos conjugados tiene dificultades para migrar a la línea de prueba. Como resultado, el complejo tiende a permanecer en el fondo de la tira reactiva o en la almohadilla. Con la presente invención, las bacterias de la muestra se aplican (después de filtrar) directamente al sitio de prueba y se inmovilizan allí, mientras que el conjugado marcador puede migrar libremente sin la muestra al sitio de prueba. Cuando el conjugado marcador llega al sitio de prueba, las bacterias ya capturadas por el anticuerpo inmovilizado en el sitio de prueba se unirán al conjugado. De este modo, el sistema de la presente invención es extremadamente sensible y específico.

Otra ventaja más de la invención es la capacidad de proporcionar pruebas para múltiples enfermedades infecciosas con alta sensibilidad y sin comprometer la especificidad debido a la reactividad cruzada o disminución de la sensibilidad de múltiples analitos cuando se han impreso como líneas separadas en una zona de prueba. En particular, en los ensayos de flujo lateral tradicionales, la muestra y el conjugado migran juntos. Si se proporcionan múltiples líneas de prueba en dispositivos de la técnica anterior, cada línea puede retener el analito o reaccionar de forma cruzada con el analito de modo que el resultado visible en las siguientes líneas se debilite cada vez más. En contraste, con la presente invención, las muestras que contienen varios analitos migrarán a la zona de prueba sin el conjugado y alcanzarán varias líneas al mismo tiempo. De este modo, los analitos se pueden unir por igual a las varias líneas de modo que se pueda mantener el mismo nivel de sensibilidad. Luego, el conjugado se introduce en una ruta de migración distinta y puede unirse a los complejos ya inmovilizados en las líneas. Por ejemplo, para la detección simultánea de anticuerpos contra el VIH y la TB en una muestra de un paciente, los antígenos del VIH y los antígenos de la TB se inmovilizan como líneas separadas en la zona de prueba, y la muestra se suministra a una tira para la migración y la unión en la zona de prueba. A continuación, se agrega la solución reguladora a la otra tira para permitir que el oro o el látex de la proteína A migren y se una al complejo antígeno-anticuerpo del VIH y al complejo antígeno-anticuerpo de TB. Debido a la alta sensibilidad de la prueba, se detectará TB si está presente. Esto es importante, porque en los pacientes coinfectados por el VIH y la tuberculosis, el título de anticuerpos tiende a ser bajo para TB.

Según otro aspecto de la invención, cuando se proporcionan pruebas para múltiples enfermedades infecciosas (por ejemplo, VIH y TB), se pueden usar partículas de látex de diferentes colores para conjugar a diferentes antígenos o anticuerpos proporcionados en la almohadilla de conjugado o en la solución reguladora. Como resultado, aparecerán diferentes líneas de color en la zona de prueba, con un color (por ejemplo, rojo) correspondiente a una primera enfermedad (por ejemplo, VIH), y un segundo color (por ejemplo, azul) correspondiente a una segunda enfermedad (por ejemplo, TB).

Como apreciarán los expertos en la técnica, el tiempo de espera entre el suministro de la muestra a una tira sorbente y el suministro de solución reguladora a la otra tira sorbente puede variar dependiendo de la viscosidad de la muestra y de los diversos atributos de la tira sorbente que recibe la muestra, incluyendo, por ejemplo, el tamaño de los poros y la longitud de la tira. De este modo, por lo general, las instrucciones se incluirán con el dispositivo de prueba indicando al usuario que espere una cantidad predeterminada de tiempo (por ejemplo, cinco minutos) después de agregar la muestra (y la solución reguladora opcional) a una tira, para agregar la solución reguladora a la otra tira. Para obtener resultados óptimos en el mayor porcentaje de casos, se elige que el tiempo de espera sea sustancialmente mayor al que realmente se necesita. De este modo, de acuerdo con otro aspecto de la invención, con el fin de reducir el tiempo de espera, se proporciona colorante alimentario visible u otro tinte soluble en agua en el sitio de prueba de cualquiera de las realizaciones de la invención descritas anteriormente. Cuando la muestra y la solución reguladora opcional se proporcionan al dispositivo de prueba, cuando la muestra migra al sitio de prueba, el tinte en el sitio de prueba se diluye y desaparece a simple vista, proporcionando así un indicador visible de que la solución reguladora se puede agregar correctamente a la otra tira sin afectar la eficacia de la prueba.

Con un dispositivo de prueba provisto de tinte visible en el sitio de prueba, se indica al usuario que agregue la solución reguladora después de que el color desaparezca en el sitio de prueba. De este modo, según un método como se describe en este documento, un dispositivo de prueba para determinar la presencia de un ligando en una muestra líquida se proporciona con un sitio de prueba que tiene un mecanismo de unión de ligando inmovilizado y un indicador

soluble visible. Se aplica una muestra al dispositivo de prueba y se visualiza el sitio de prueba para observar la desaparición del indicador visible. A partir de entonces, se aplica una solución (de solución reguladora) al dispositivo de prueba. Después de algún tiempo, se puede inspeccionar el sitio de prueba para determinar una indicación de la presencia o ausencia del ligando en la muestra.

- 5 Las figuras 13A-13G son fotografías/diagramas instructivos compuestos de un producto de casete de prueba de VIH 1/2 según la invención que utiliza un tinte visible en el sitio de prueba. El producto de prueba está construido sustancialmente según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente y está provisto de una carcasa de casete de plástico con cuatro aberturas o ventanas. Una primera de las cuatro aberturas está marcada como S+B y se proporciona para recibir una muestra de prueba más solución reguladora. Una segunda de las cuatro aberturas está marcada con B y se proporciona para recibir solución reguladora adicional. Un tercio de las cuatro aberturas está marcado con los números 1, 2, 3, 4 y 5 y está provisto de líneas de prueba correspondientes a cinco antígenos o péptidos del VIH diferentes (preferiblemente p24, gp41, gp 120, gp160 y gp36 respectivamente). Una cuarta abertura marcada con C se proporciona con la línea de control. Las líneas de prueba que aparecen en la tercera abertura están provistas de un tinte de color (por ejemplo, azul) para que sean visibles. La línea de control que aparece en la cuarta abertura también está provista de un tinte de color (por ejemplo, verde) para que sea visible.

El aparato mostrado en la figura 13A se usa añadiendo preferiblemente aproximadamente 10 µl de suero o sangre al pocillo de la muestra marcada como S+B. Luego, como se ve en la figura 13B, preferiblemente se agregan aproximadamente 30 µl de solución reguladora al mismo pocillo de muestra. La migración de la muestra (por lo general con la ayuda de la solución reguladora) a la zona de prueba hará que el tinte en las líneas de prueba y control se disipe. La desaparición del tinte de las líneas confirma que la muestra ha llegado al área de prueba. En ese momento, y como se muestra en la figura 13C, preferiblemente se agregan aproximadamente 90 µl de solución reguladora a la abertura marcada con B para provocar la migración de un conjugado marcador al área de prueba. Después de un período de tiempo, se pueden leer los resultados. Se ven cuatro ejemplos de resultados en las figuras 13D-13G. En la figura 13D, solo se ve la línea de control C, lo que indica un resultado válido de que la muestra analizó negativamente los anticuerpos del VIH1 y VIH2. En la figura 13E, se ven la línea de control y las líneas 1, 2, 3 y 4, lo que indica un resultado válido de que la muestra probó positivamente para cuatro anticuerpos de tipo VIH1 diferentes pero negativamente para anticuerpos de tipo VIH2. En la figura 13F, se ven la línea de control y la línea 5, lo que indica un resultado válido de que la muestra analizó positivamente los anticuerpos de tipo VIH2 pero negativamente para los cuatro anticuerpos de tipo VIH1 diferentes. En la figura 13G, se ven la línea de control y todas las líneas 1-5, lo que indica un resultado válido de que la muestra analizó positivamente cuatro anticuerpos de tipo VIH1 diferentes y anticuerpos de tipo VIH2. Se observa que si no se ve la línea de control C, los resultados de la prueba no se interpretan como válidos. También se observa que es posible que solo una, dos o tres de las líneas 1-4 puedan indicar un resultado positivo, como se verá con referencia a las figuras 15A-15D, ya que una muestra no tiene que incluir los cuatro anticuerpos de tipo VIH1 diferentes o ninguno.

- 35 Las figuras 14A-14G son diagramas de instrucciones/fotografías compuestas de un producto de prueba de tira reactiva de VIH 1/2 según la invención. Las figuras 14A-14G corresponden completamente a las figuras 13A-13G discutido anteriormente, excepto que en lugar de incorporar un casete de plástico con ventanas, el producto de prueba de las figuras 14A-14G es un producto de tira reactiva sobre cartón.

Las figuras 15A-15G son fotografías/diagramas instructivos compuestos de un producto de casete de prueba/confirmación de VIH 1/2 según la invención que utiliza un tinte visible en el sitio de prueba. El producto de prueba/confirmación es sustancialmente el mismo que el producto de las figuras 13A-13G y se construye sustancialmente según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, excepto que el producto de las figuras 15A-15G está provisto de una carcasa de casete de plástico con cinco aberturas o ventanas en lugar de las cuatro del producto de las figuras 13A-13G. Una primera de las cinco aberturas está marcada como S+B y se proporciona para recibir una muestra de prueba más solución reguladora. Una segunda de las cinco aberturas está marcada con B y se proporciona para recibir una solución reguladora adicional. Una tercera parte de las cinco aberturas está marcada con una T y corresponde a una línea de prueba que tiene todos los antígenos o péptidos del VIH contenidos en la cuarta ventana. La cuarta de las cinco aberturas está marcada con los números 1, 2, 3, 4 y 5 y está provista de líneas de prueba correspondientes a cinco antígenos o péptidos del VIH diferentes (preferiblemente p24, gp41, gp120, gp160 y gp36 respectivamente). Una quinta abertura marcada con C se proporciona con la línea de control. Las líneas de prueba que aparecen en la segunda y tercera aberturas se proporcionan con un tinte de color (por ejemplo, azul) para que sean visibles. La línea de control que aparece en la cuarta abertura también está provista de un tinte de color (por ejemplo, verde) para que sea visible.

El producto de prueba de cribado/confirmación de las figuras 15A-15G se usa de la misma manera que el producto de las figuras 13A-13G. La diferencia entre los productos es que la tercera ventana T proporciona un resultado de cribado que es digital; esto es, una respuesta de sí o no a la muestra que contiene anticuerpos del VIH. En particular, debido a que la línea de prueba T contiene una combinación de todos los antígenos o péptidos proporcionados en las líneas 1-5 de prueba, será observable si se observa alguna de las otras líneas 1-5 de prueba. Las líneas 1-5 de prueba proporcionan detalles sobre el resultado indicado; esto es, que

- 60 Se detecta (n) un anticuerpo o anticuerpos de VIH1, y si se ha detectado un anticuerpo de VIH2.

Las figuras 16A-16E son fotografías de resultados de pruebas reales obtenidos con tiras reactivas de VIH 1/2 de la invención. Como se ve en la figura 16A, se ven la línea de control y una línea (gp36), lo que indica una prueba válida con la muestra dando positivo para anticuerpos de tipo VIH2. La figura 16B muestra el control observable y la primera y la quinta línea de prueba, lo que indica una prueba válida con la muestra que da positivo para los anticuerpos del VIH1 que se unen al antígeno p24 y los anticuerpos de tipo VIH2 (que se unen al antígeno gp36) y negativo para otros anticuerpos de VIH1. La figura 16C muestra el control observable y las segundas líneas de prueba, lo que indica una prueba válida con la muestra que da positivo para anticuerpos del VIH1 que se unen al antígeno gp41 y negativo para otros anticuerpos del VIH1 y anticuerpos de tipo VIH2. La figura 16D muestra el control observable y la primera, segunda y cuarta líneas de prueba, lo que indica una prueba válida con la muestra dando positivo para anticuerpos del VIH1 que se unen a los antígenos gp24, gp41 y gp160, y negativo para otros anticuerpos del VIH1 y anticuerpos de tipo VIH2. La figura 16E muestra el control observable y las líneas de prueba de la primera a la quinta, lo que indica una prueba válida con la muestra dando positivo a todos los anticuerpos del VIH1 y los anticuerpos del VIH2 que se están probando.

Ejemplo 1 - Prueba de VIH

Preparación de la tira 1 para recibir la muestra y la solución reguladora - Se preparó una tira reactiva para la recogida y transporte de la muestra de la siguiente manera. Se laminó una membrana de nitrocelulosa (5 x 25 mm) con un tamaño de poro de 20-30 micrómetros (Whatman Inc., EE.UU.) sobre una tarjeta de plástico. Se trató una almohadilla de muestra de papel de celulosa (S&S, Alemania) con PBS, 8.4 y NP40 y se unió a la membrana de nitrocelulosa. Se usó el mismo procedimiento para fabricar múltiples tiras 1 reactivas.

Preparación de la tira 2 solo para recibir de solución reguladora y con zona conjugada y líneas de prueba y control - Se preparó una tira reactiva para la detección de anticuerpos contra VIH1 y VIH2 de la siguiente manera. Los péptidos sintéticos gp41, gp120 del VIH1 y el péptido sintético gp36 del VIH2 se biotinilaron y luego se mezclaron con Avidina (Zymed, Inc. EE.UU.). Este cóctel se filtró mediante un filtro de 0.2 micrómetros y se inmovilizó a una concentración de 0.25 - 0,50 mg/ml en una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 10-15 micrómetros (MDI Ltd., Ambella, India) para ser usado como línea de prueba usando una impresora ISO-Flow (Imagine Technology, Inc. EE. UU.). La proteína A (Zymed Inc., EE. UU.) de concentración 0.25 mg/ml se inmovilizó de la misma manera para usarla como línea de control. La membrana se secó durante una hora a 37 °C. A continuación, la membrana se laminó sobre un soporte de membrana (G&L, Inc. EE.UU.). Se preparó una almohadilla de conjugado usando una matriz de poliéster porosa (Alstrom, Inc. EE.UU.). La almohadilla se pulverizó con proteína A (Zymed Inc., EE. UU.) que se conjugó con partículas de oro coloidal púrpura de aproximadamente 40 nm y OD 60 resuspendido con solución reguladora del conjugado (PBS 50 mM, sacarosa, BSA, VPA, Tween 20) y se secó a 37 °C, durante una hora. Se preparó una tira reactiva (7.2 x 62 mm) uniendo la almohadilla de conjugado de oro, una almohadilla de muestra (S&S Inc., Alemania) y una almohadilla de pozo (S&S Inc., Alemania) a la membrana de nitrocelulosa unida a la tarjeta laminada. Se usó el mismo procedimiento para hacer múltiples tiras reactivas 2.

Montaje de la tira 1 y la tira 2 en un casete - La tira 2 (7.2x62 mm) se colocó en la parte inferior del casete con su tarjeta laminada en la parte inferior y la almohadilla de conjugado, almohadilla de muestra, líneas de prueba y control mirando hacia arriba. Luego, la tira 1 se colocó en la porción inferior del casete. La tira 1 se colocó de modo que tocara la tira 2 en la ubicación del sitio de prueba con la membrana de nitrocelulosa de la tira 1 tocando la membrana de nitrocelulosa de la tira 2. La parte superior del casete con aberturas separadas para la muestra y la solución reguladora, y con una ventana sobre la ubicación del sitio de prueba y control, luego se colocó en la porción inferior del casete. Se usó el mismo procedimiento para hacer múltiples ensamblajes (a los que se hace referencia a continuación como ensamblajes de VIH1/2 de Chembio DPP (plataforma de ruta doble).

Procedimiento de prueba: se agregaron 5 µl de suero/sangre a través de la abertura para la muestra y se agregó inmediatamente 1 gota (40-50 µl) de solución reguladora (PBS, pH 8.5-9.5, suero de pollo, EDTA, Tween 20) a través de la misma abertura. Después de esperar de uno a dos minutos hasta que la muestra alcanzó la zona de prueba y desaparecieron las líneas de color (control de calidad), se agregaron tres o cuatro gotas (aproximadamente 130-150 µl) de la misma solución reguladora a través de la abertura para la solución reguladora. Después de quince minutos, se leyeron los resultados de la prueba. La aparición de dos líneas rosadas (prueba y control) indicó un resultado positivo. La aparición de una sola banda (control) indicó un resultado negativo. La aparición de bandas no indicaría un resultado no válido.

Resultados de la prueba: se probó un panel comercial de rendimiento de VIH1 y VIH2 mixto (PRZ-204) de BBI Inc., EE. UU., en conjuntos preparados y ensamblados como se indica anteriormente con los siguientes resultados.

PRZ-204 BBI	Tipo de VIH	Chembio DPP VIH 1/2	Western Blot 1 Cambridge Biotech	Western Blot 2 Geniabs	ELIA 112 Abbott
1	1	POS	POS	IND	POS
2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	2	POS	IND	POS	POS

4	2	POS	POS	POS	POS
5	1	POS	POS	IND	POS
6	2	POS	IND	POS	POS
7	1	POS	POS	IND	POS
8	2	POS	IND	POS	POS
9	1	POS	POS	IND	POS
10	1	POS	POS	IND	POS
11	2	POS	POS	POS	POS
12	2	POS	POS	POS	POS
13	1	POS	POS	IND	POS
14	1	POS	POS	IND	POS
15	2	POS	IND	IND	POS

Todas las muestras se detectaron correctamente mediante las pruebas Chembio DPP VIH 1/2 y ELIA 1/2 Abbott. El número 15 de muestra fue indeterminada con ambas pruebas Western Blot según se interpretaron usando los criterios ASTPHLD/CDC (MMWR Vol. 38 S-7 1989), pero fueron positivas con las pruebas Chembio DPP VIH 1/2 y ELIA 1/2 Abbott.

Ejemplo 2 - Mycobacterium Tuberculosis (TB)

Se prepararon dispositivos de prueba como en el ejemplo 1 para la detección de anticuerpos contra TB modificando la tira 2 solamente. La tira 2 se modificó obteniendo una mezcla de antígenos recombinantes de TB (F10, E6, P10, 14, 16) a una concentración de 1.0 mg/ml en lugar de los péptidos del VIH, e inmovilizando los antígenos recombinantes de TB a 0,5 µl/cm en una línea de prueba en la membrana para producir una primera línea de prueba (T1). También se inmovilizó en el área de prueba una segunda línea de prueba (T2) del antígeno de TB Lipoarabinmannan (LAM) a una concentración de 0.05 mg/ml e inmovilizada a 0.5 µl/cm. Se inmovilizó proteína A diluida con PBS 7.4 a una concentración de 0.25 mg/ml como línea de control. Se aplicaron a la almohadilla de conjugado proteína A/G (Pierce, EE. UU.) e IgM antihumana (Sigma, EE. UU.) conjugadas con partículas de oro coloidal púrpura de aproximadamente 40 nm.

Procedimiento de prueba - El procedimiento de prueba para la prueba de TB fue el mismo que para el ejemplo 1 excepto que el volumen de la muestra fue de 10 µl de suero.

Resultados de la prueba: se evaluaron un total de 300 muestras comerciales de TB (Zeptomatrix Inc, EE.UU.) con la prueba DPP TB. Todas las muestras positivas tuvieron un resultado de cultivo positivo, pero algunas de las muestras fueron frotis negativas y coinfectadas por VIH. Con estas muestras endémicas se logró una sensibilidad y especificidad generales del 75% y el 90% respectivamente.

Ejemplo 3 - Tira reactiva de confirmación del VIH

Se prepararon dispositivos de prueba en forma de tiras reactivas de confirmación para la detección de anticuerpos VIH1 y VIH2 como en el ejemplo 1. Sin embargo, la tira 1 y la tira 2 se unieron usando un adhesivo (G&L Inc, EE. UU.) en una tarjeta laminada sin ningún tipo de carcasa de plástico (esto es, una "tira reactiva"). Se inmovilizaron cinco antígenos diferentes VIH1 (p24, gp41, gp120, gp160) y VIH2 (gp36) (0.25-0.50 mg/ml) como cinco líneas diferentes en el área de prueba. Estos antígenos eran péptidos sintéticos recombinantes y antígenos nativos. Se inmovilizó la proteína A diluida con PBS 7.4 a una concentración de 0.25 mg/ml como línea de control. Se pulverizó proteína A (Zymed, EE.UU.) conjugada con partículas de oro coloidal púrpura de aproximadamente 40 nm sobre la almohadilla de conjugado y se usó como sistema de detección.

Procedimiento de prueba: el procedimiento de prueba fue el mismo que el del ejemplo 1, excepto que se usaron volúmenes de muestra de 10 µl de suero.

Resultados de la prueba: se evaluaron con este ensayo muestras comerciales de paneles de VIH (BBI Inc, EE.UU., Zeptomatrix Inc, EE.UU. y Teragenix Inc EE.UU.). Los resultados mostraron que la prueba de confirmación de DPP VIH detectó correctamente las muestras de VIH1 y VIH2 y tuvo una correlación del 100% con Western Blot y EIA.

Ejemplo 4 - Prueba de VIH

Se prepararon dispositivos de prueba sustancialmente idénticos a los dispositivos de prueba del ejemplo 1 con la diferencia de que la tira 1 se alargó en cada prueba, de modo que en lugar de que la tira 1 y la tira 2 formaran una "T", formaron una configuración "+". Los resultados fueron como en el ejemplo 1.

Ejemplo 5 - Prueba de VIH

- 5 Se prepararon dispositivos de prueba sustancialmente como en el ejemplo 1, excepto que las líneas de prueba y control se aplican a la tira 1 en lugar de a la tira 2. los resultados fueron como en el ejemplo 1.

Ejemplo 6 - Prueba de VIH

- 10 Se prepararon dispositivos de prueba sustancialmente como en el ejemplo 1, excepto que en el área de prueba se inmovilizó un anticuerpo policlonal contra un antígeno de VIH P24 en la línea de prueba y un anticuerpo monoclonal contra el antígeno de VIH P24 se conjugó con el oro coloidal. Los resultados mostraron que se podía detectar un nivel de picogramos de antígeno P24 en muestras de suero.

Ejemplo 7 - Bacteria Leptospira

- 15 Se prepararon dispositivos de prueba sustancialmente como en el ejemplo 1, excepto que en el área de prueba, se mezclaron e inmovilizaron cuatro antígenos lij recombinantes (A, B, C, D) como línea de prueba. Para el conjugado, se aplicaron a la almohadilla del conjugado Proteína A/G (Pierce, EE. UU.) e IgM antihumana (Sigma, EE. UU.) conjugadas con partículas de oro coloidal púrpura de aproximadamente 40 nm. Con más de 300 muestras endémicas analizadas en Brasil y Tailandia, se obtuvo una sensibilidad general de aproximadamente el 70% con muestras de fase aguda, y se obtuvo aproximadamente el 90% con muestras de fase convaleciente, y una especificidad de aproximadamente 95%.

- 20 Se han descrito e ilustrado en este documento varias realizaciones de inmunoensayos y su uso. Aunque se han descrito realizaciones particulares de la invención, no se pretende que la invención se limite a las mismas, ya que se pretende que la invención tenga un alcance tan amplio como lo permita la técnica y que la especificación se lea de la misma manera. De este modo, aunque la especificación analiza la unión de ligando usando reacciones de antígeno/anticuerpo, también pueden usarse otros mecanismos de unión de ligando tales como unión de aptámero, unión de ácido nucleico, unión enzimática, etc. Además, aunque se describe que las células de prueba tienen una sola línea para probar un solo ligando, dos líneas para probar dos ligandos, tres líneas para probar tres ligandos y cinco líneas de prueba para probar cinco ligandos, se apreciará que se pueden usar diferentes números de líneas para probar diferentes números de ligandos. En tal caso, se puede usar una sola carcasa con un solo orificio para la muestra, o alternativamente, se pueden usar múltiples orificios si se desea. Cuando se usan múltiples orificios, se pueden usar múltiples tiras para una o más muestras proporcionadas. Preferiblemente, las múltiples tiras tocarían (por ejemplo, superpondrían o subyacen) una sola tira proporcionando una ruta de migración para el conjugado. También puede ser posible proporcionar un único orificio que se asiente o conduzca a dos tiras adyacentes adaptadas para la migración de la muestra. Además, aunque se describe que las celdas de prueba tienen orificios en la pared superior de una carcasa para recibir la muestra y el subsistema de solución reguladora o conjugado de solución reguladora, se apreciará que se pueden proporcionar uno o ambos orificios en la pared del extremo o pared lateral de la carcasa. De manera similar, aunque se describió que el material sorbente incluye preferiblemente un soporte de plástico delgado, se apreciará que el soporte de plástico se podría proporcionar solo en ciertas ubicaciones o no proporcionarse en absoluto. Cuando solo se proporcionan respaldos parciales o no se proporcionan respaldos, los sitios de prueba y control se pueden ubicar en uno o ambos lados del material sorbente. De hecho, el sitio de prueba y el sitio de control se pueden configurar de manera diferente entre sí. Además, aunque se describió que la invención usa una carcasa en forma de T, y usa materiales sorbentes que son perpendiculares entre sí, se apreciará que la carcasa podría adoptar diferentes formas (por ejemplo, rectangular, en forma de pistola) mientras proporciona materiales sorbentes que son perpendiculares entre sí.

- 45 Los expertos en la técnica también apreciarán que la carcasa se puede modificar de formas adicionales para incluir ventanas separadas para cada línea de prueba. Además, aunque la invención se describió junto con el uso de una solución reguladora que se agrega a la ruta de migración del conjugado y, opcionalmente, a la ruta de migración de la muestra, se apreciará que una o más soluciones reguladoras se pueden elegir como desea agregar a las rutas de migración según la prueba o las pruebas que se realizarán. De este modo, a menudo se usan soluciones reguladoras tales como soluciones reguladoras de fosfato o soluciones reguladoras TRIS (tris hidroximetilaminometano). Sin embargo, la invención pretende abarcar el uso de cualquier diluyente, incluida agua. Además, el diluyente puede, si es necesario, agregarse y mezclarse con la muestra antes de agregar la muestra al material sorbente o la muestra se puede depositar primero y el diluyente se puede agregar después. Asimismo, se puede usar cualquier diluyente capaz de hacer que el conjugado migre y se puede mezclar previamente con el conjugado en un sistema de conjugado líquido, o se puede proporcionar a la ruta de migración del conjugado en un sistema de conjugado seco.

55

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de prueba de inmunoensayo (10, 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10', 110, 210) para su uso con un conjugado de inmunoensayo que tiene un marcador, comprendiendo el dispositivo de prueba:
 - 5 a) un primer material sorbente que es una tira (30, 30', 130, 230) que tiene una ubicación de recepción de solución (24, 24', 124) dispuesta para recibir una solución conjugada que tiene el inmunoensayo conjugado que comprende un antígeno o un anticuerpo conjugado a un marcador de color cuando se usa un sistema de conjugado líquido, o una solución reguladora cuando se usa un sistema de conjugado seco con el conjugado de inmunoensayo que comprende un antígeno o un anticuerpo conjugado con un marcador de color proporcionado en el primer material sorbente, y se define una primera ruta de flujo de migración horizontal para la solución conjugada o la solución reguladora y el conjugado; y
 - 10 b) un sitio de prueba (33, 33', 133, 233) que tiene un mecanismo de unión de ligando inmovilizado y está en comunicación con dicha primera ruta de flujo de migración horizontal;caracterizado porque el dispositivo de prueba de inmunoensayo comprende además
 - 15 c) un segundo material sorbente es una tira (32, 32', 132, 232), el primer material sorbente y el segundo material sorbente son piezas separadas que se superponen entre sí y la línea de prueba está impresa en uno o ambos materiales sorbentes en la unión, el segundo material sorbente tiene una segunda ubicación (26, 26', 126) dispuesta para recibir una muestra, con el segundo material sorbente definiendo una segunda ruta de migración horizontal para la muestra a dicho sitio de prueba que es distinta de la primera ruta de migración, y
 - 20 en el que dichos primer y segundo materiales sorbentes que son tiras están dispuestos de manera que en la unión de dichas tiras se define una zona de prueba con dicho sitio de prueba en la que se localizan antígenos o anticuerpos inmovilizados u otras moléculas de unión a ligando,
 - en el que el término "distinto" cuando se usa junto con las palabras "ruta de flujo" o "ruta de migración" se entenderá que significa "no en comunicación fluida excepto a través de una zona de prueba";
 - en el que dichos primer y segundo materiales sorbentes que son tiras están dispuestos en una configuración en "T",
 - 25 donde la primera ubicación para recibir la solución reguladora o solución reguladora-conjugada se ubica cerca de un extremo de la barra superior de la T, la segunda ubicación para recibir la muestra está ubicada cerca del final del tallo de la T, y los materiales sorbentes se superponen entre sí en la intersección; o en el que dichos primer y segundo materiales sorbentes que son tiras están dispuestos en una configuración "+",
 - 30 donde la primera ubicación para recibir la solución reguladora o la solución reguladora-conjugada está ubicada cerca de un extremo de una primera barra, la segunda ubicación para recibir la muestra es ubicado cerca del final de un extremo de la segunda barra, y los materiales sorbentes se superponen entre sí en la intersección.
2. El dispositivo de prueba según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de prueba se proporciona en una carcasa que está provista de una primera abertura adyacente a la primera ubicación y una segunda abertura adyacente a la segunda ubicación.
- 35 3. Dispositivo de prueba según la reivindicación 2, en el que se proporciona una ventana de visualización en la carcasa por encima de la línea de prueba.
4. El dispositivo de prueba según la reivindicación 3, que comprende además una línea o sitio de control que se puede ver desde la ventana de visualización.
5. El dispositivo de prueba según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los materiales, espesores y longitudes del primer y segundo materiales sorbentes se eligen para ajustar el tiempo con respecto a la muestra líquida y la solución reguladora líquida que llegan al sitio de prueba.
- 40 6. El dispositivo de prueba según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer material sorbente que es una tira tiene poros de un primer tamaño de poro, y dicho segundo material sorbente que es una tira tiene poros de un segundo tamaño de poro mayor que el primer tamaño de poro.

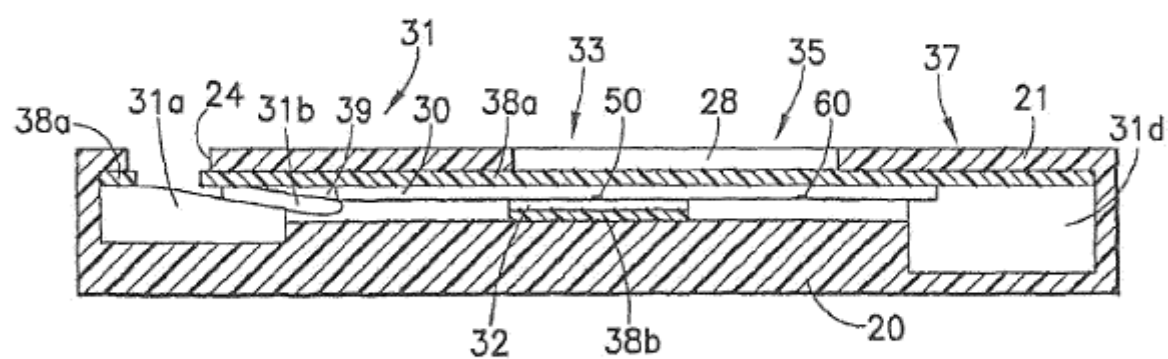
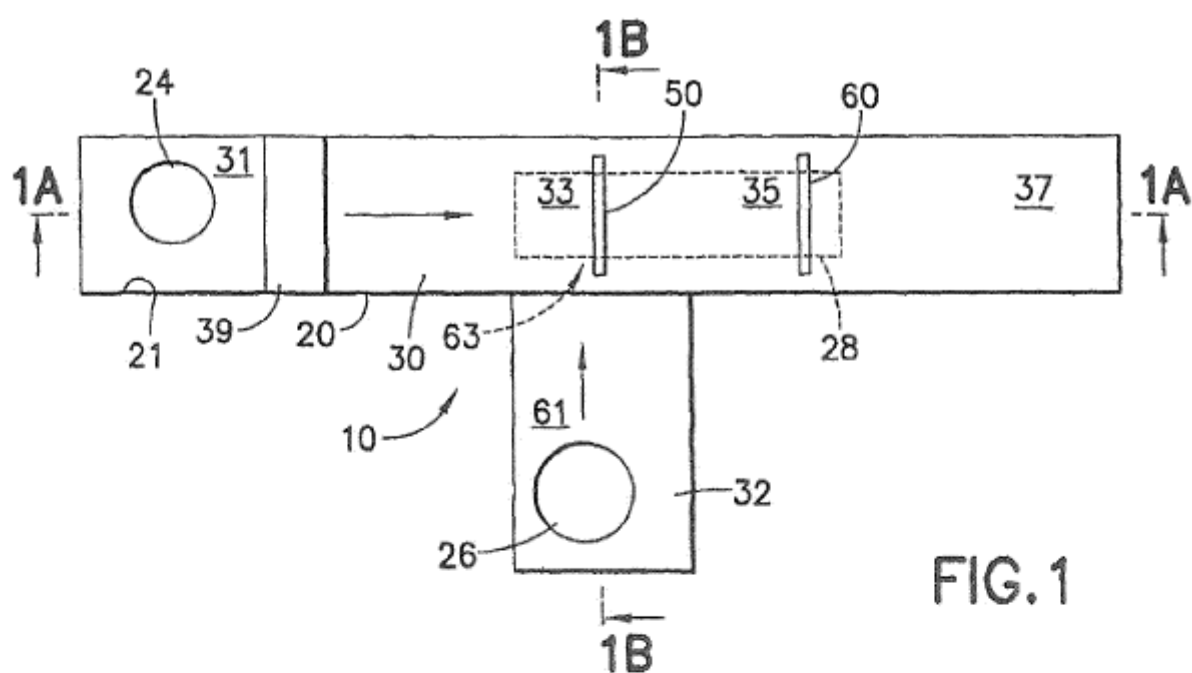


FIG. 1A

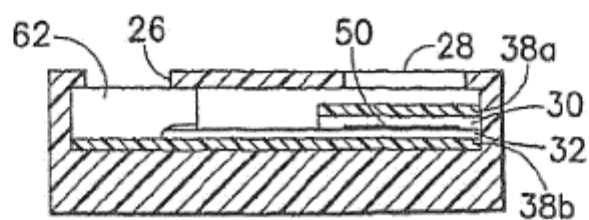


FIG. 1B

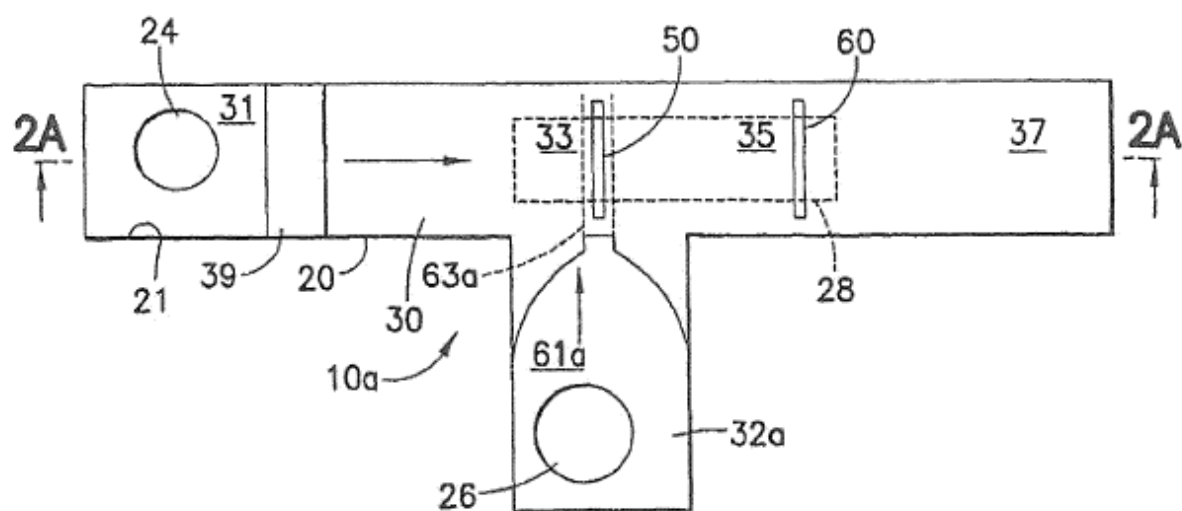


FIG. 2

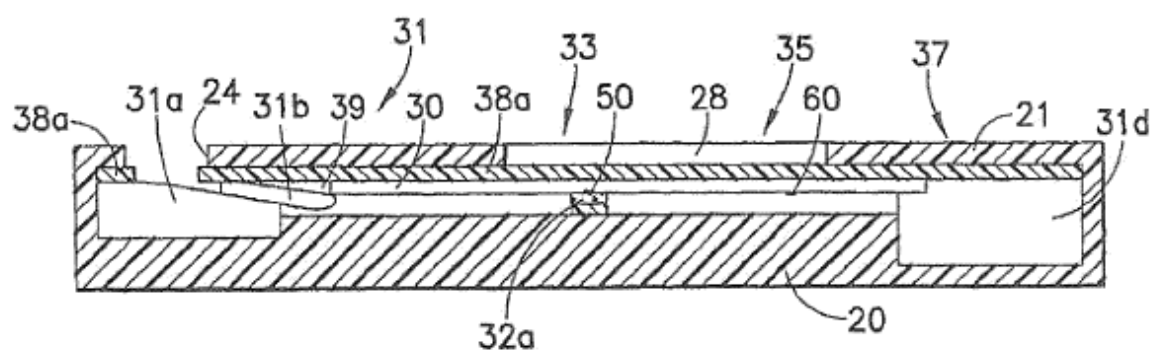


FIG. 2A

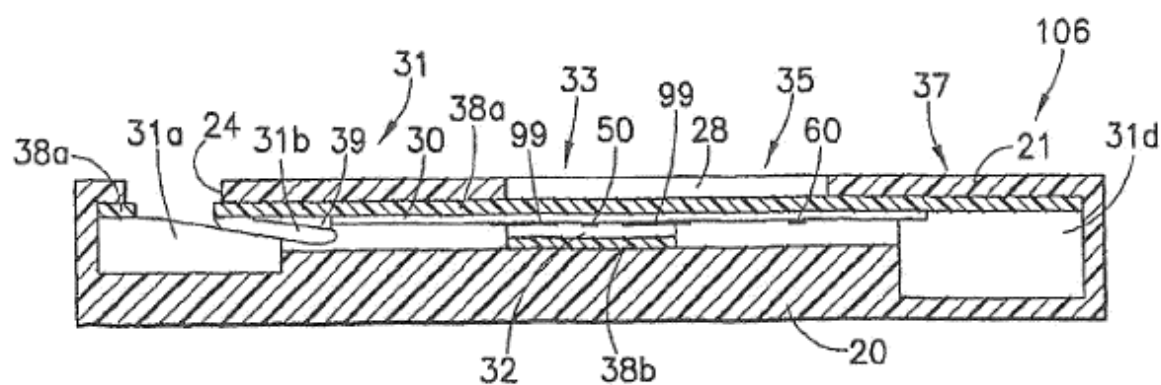


FIG. 3

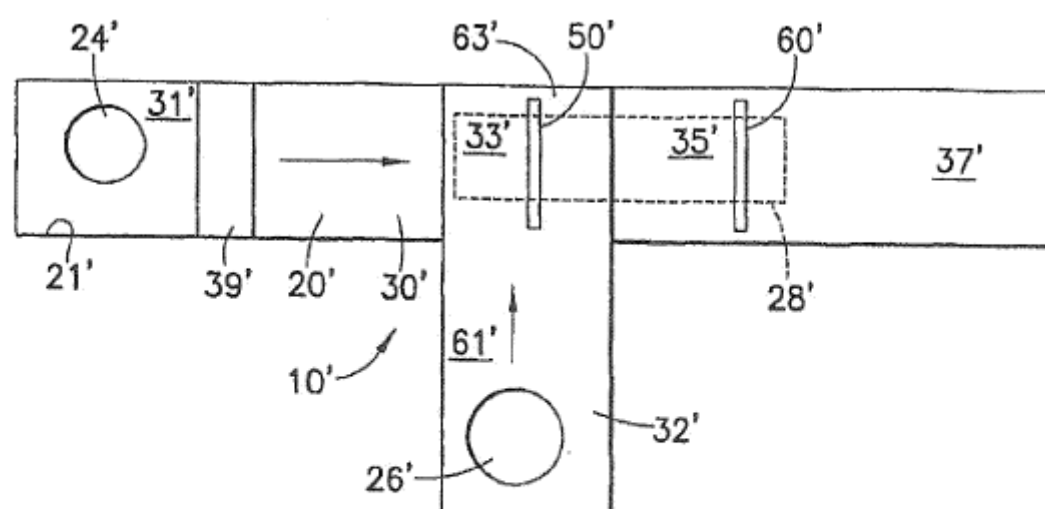


FIG. 4

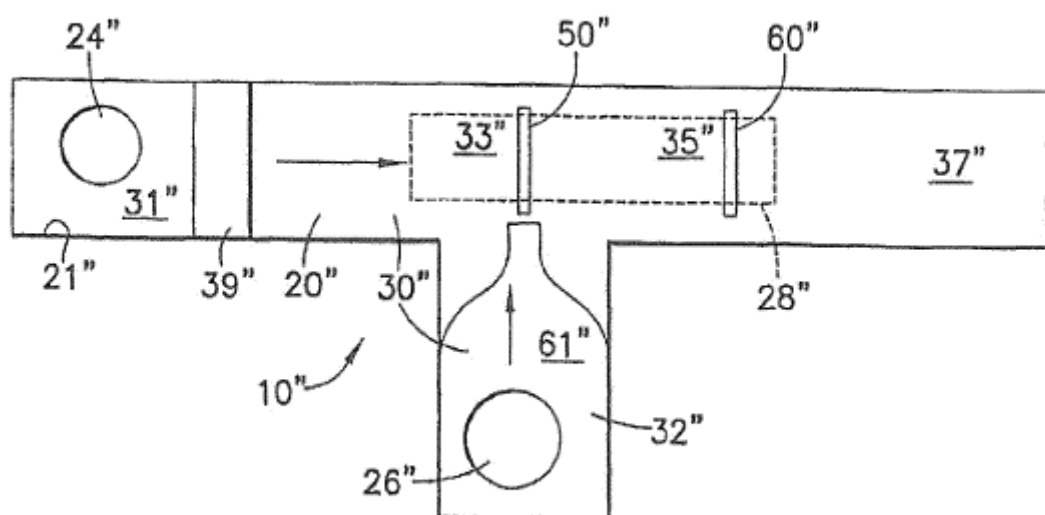


FIG. 5

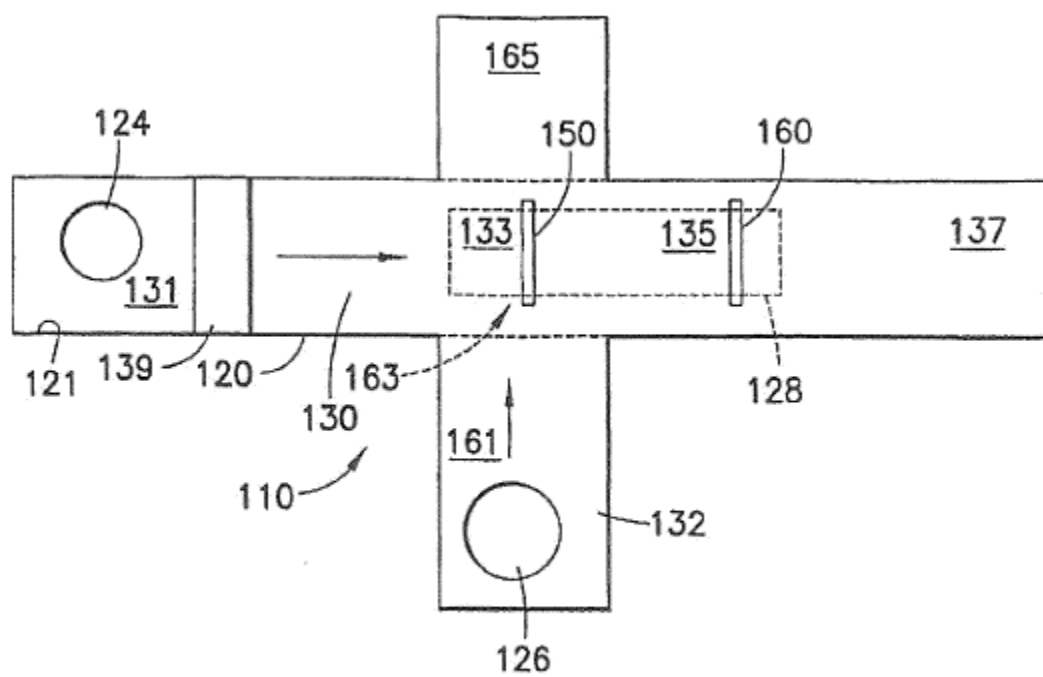


FIG. 6

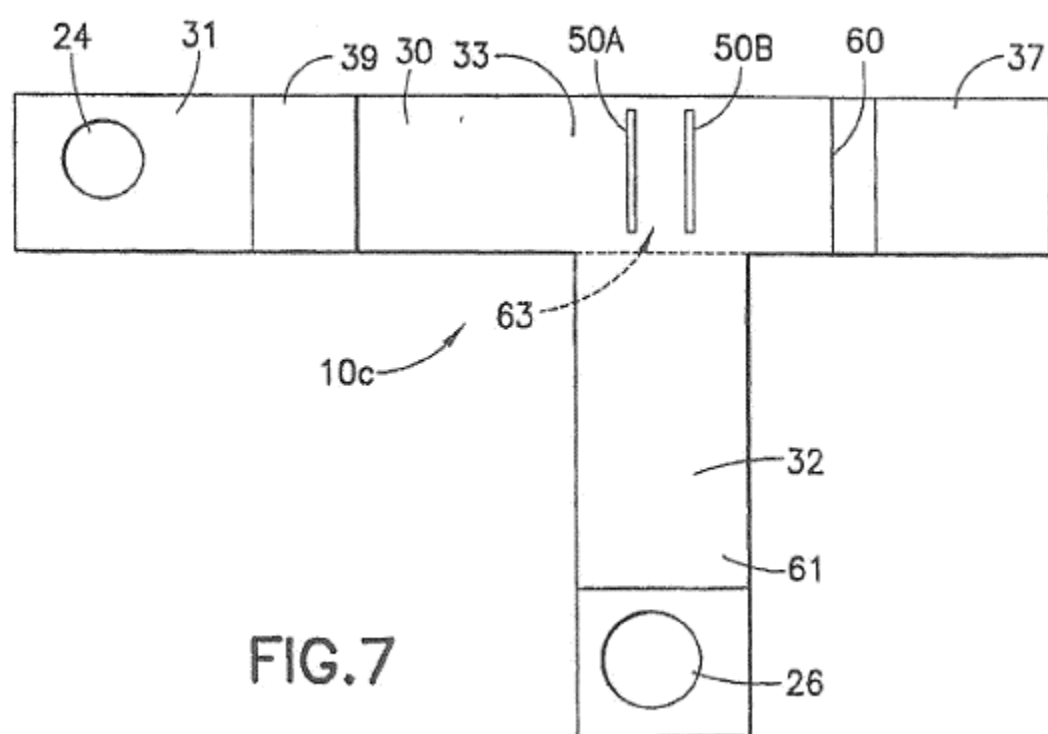
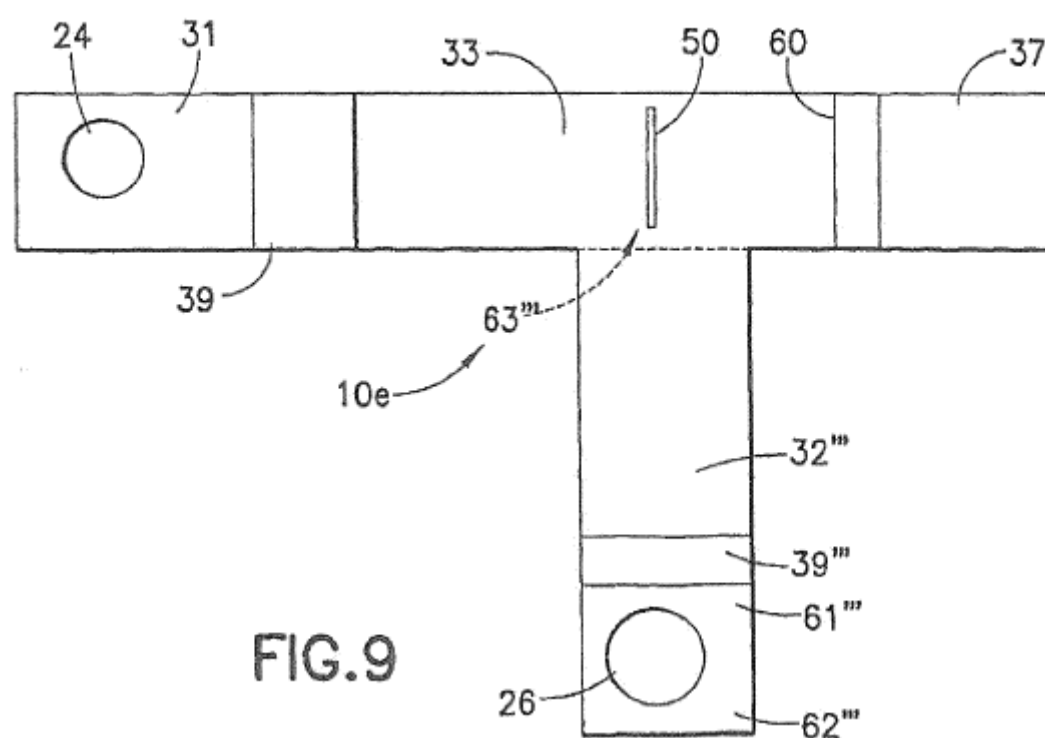
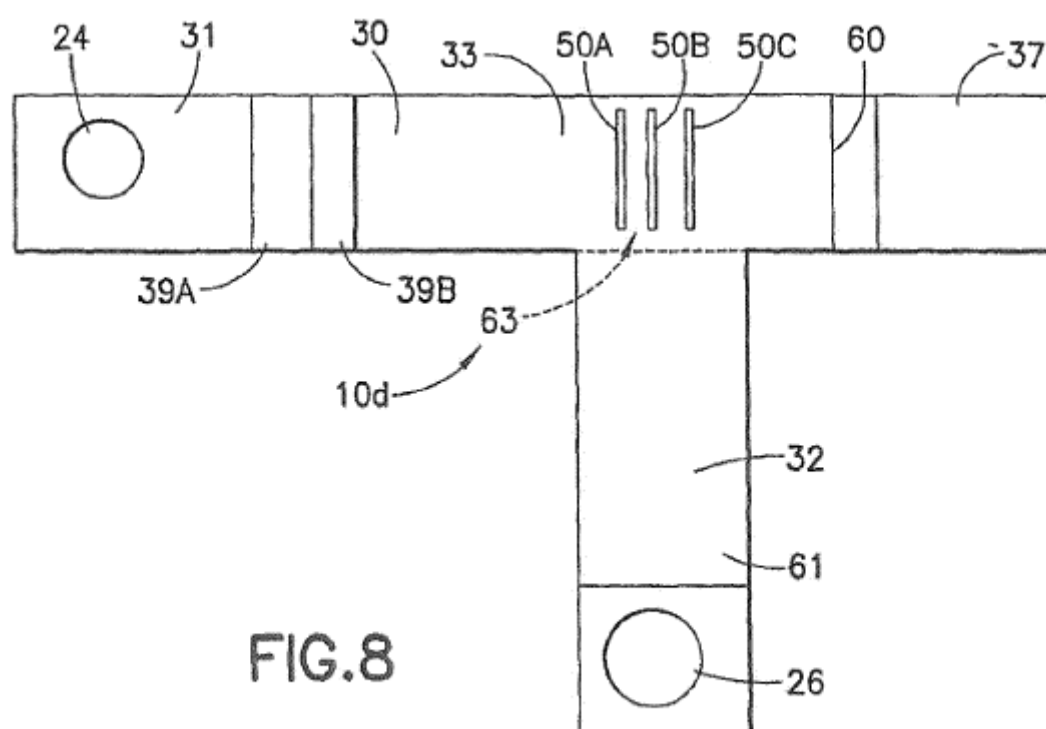


FIG.7



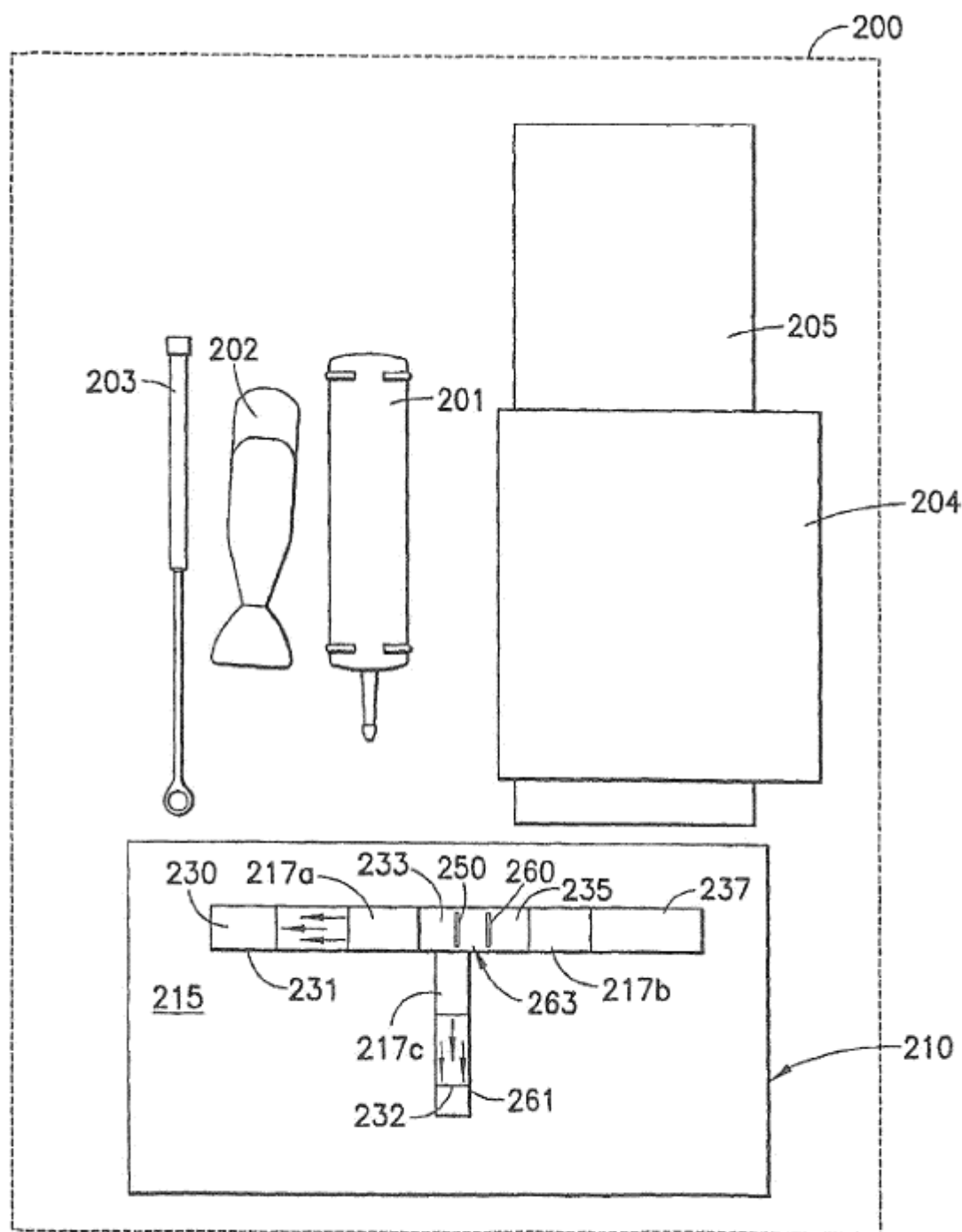


FIG.10

ENSAYO TB STAT-PAK II vs. NEW GENERATION TB

MUESTRAS: CONTROLES TBGL

	TB STAT-PAK™ II	NEW GENERATION
32 U/ml	+++	+++
8 U/ml	++	++
2 U/ml	+/-	+
1 U/ml	-	+
1/2 U/ml	-	+
1/4 U/ml	-	+
1/8 U/ml	-	-
0 U/ml	-	-

NOTA: LAS DILUCIONES ≤ 1 u/ml SE HICIERON DE LA MUESTRA DE 2 u/ml

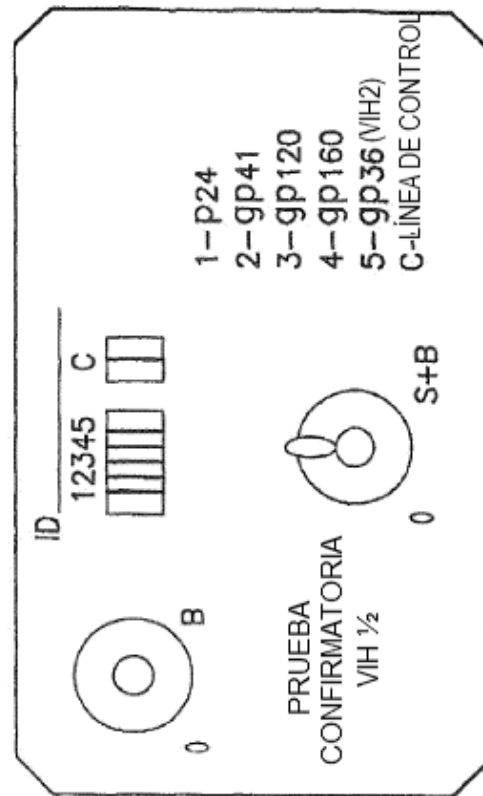
FIG.11

RESULTADOS DE LABORATORIO PARA LA PRUEBA NEW GENERATION VIH

	DILUCIÓN	PRUEBA NG VIH	VIH STAT-PAK™
VIH-1	1:64	3	3
	1:128	3	2
	1:256	3	3
	1:512	2	2
	1:1024	1	1
	1:2048	1	N
	1:4096	1	N
	1:8192	N	N
VIH-2	1:4	3	3
	1:8	3	3
	1:16	3	2
	1:32	2	2
	1:64	2	1
	1:128	2	1
	1:256	2	N
	1:512	1	N
	1:1024	N	N
	1:2048	N	N

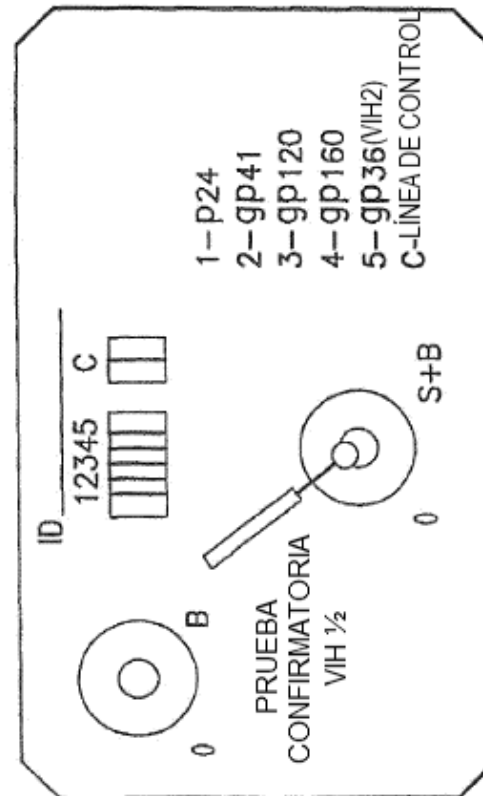
INTENSIDAD	RESULTADO
1 —	DÉBIL POS
2 —	MEDIO POS
3 —	FUERTE POS
N —	NEGATIVO

FIG.12



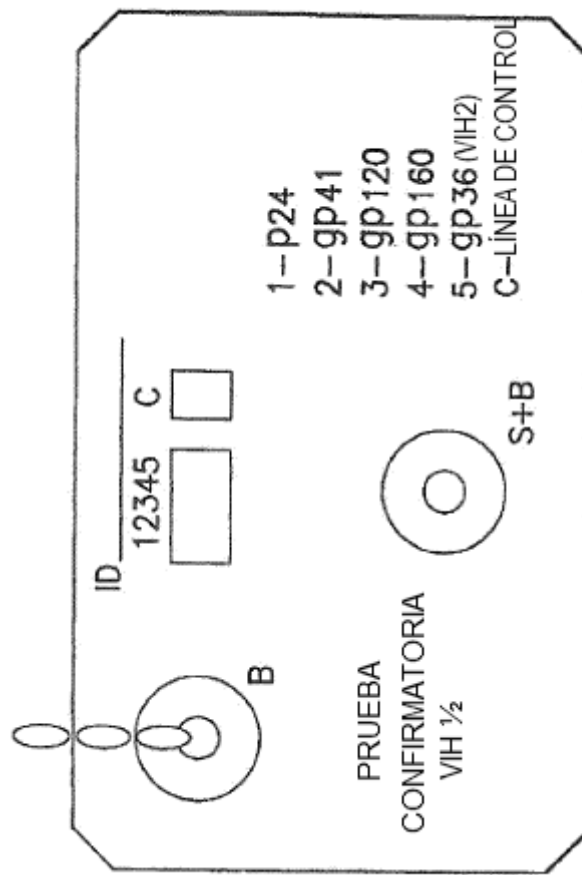
1. AGREGAR 1 GOTTA (30 μ l) DE SOLUCIÓN REGULADORA AL POCILLO DE MUESTRA (S+B)

FIG.13B



1. AGREGAR 10 μ l DE SUERO/SANGRE AL POCILLO DE MUESTRA (S+B)

FIG.13A

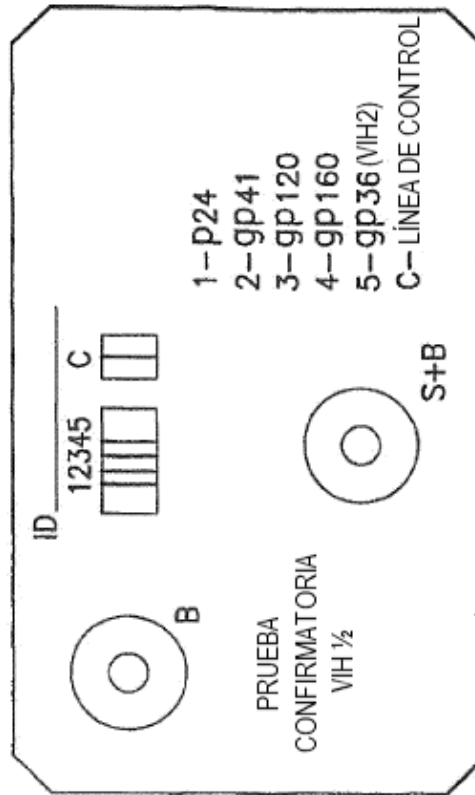


3. AGREGAR 3 GOTAS (90 μ l) DE SOLUCIÓN REGULADORA AL POCILLO DE SOLUCIÓN REGULADORA (B) CUANDO LAS LÍNEAS COLOREADAS DESAPARECEN COMPLETAMENTE

FIG.13C

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O
RESULTADO POSITIVO INDICA LA PRESENCIA DE
ANTÍGENO O ANTÍGENOS (DOS O SEIS LÍNEAS)

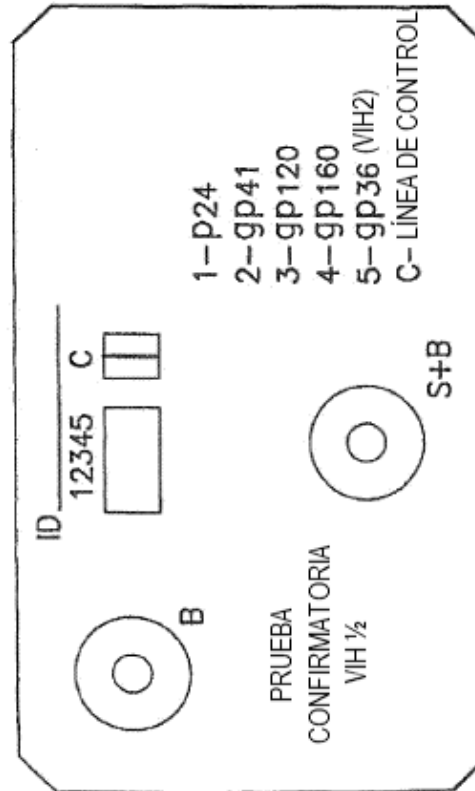


RESULTADO POSITIVO VIH1
(AL MENOS DOS ANTÍGENOS DE VIH1 REACTIVOS)

FIG.13E

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O
RESULTADO POSITIVO INDICA LA PRESENCIA DE
ANTÍGENO O ANTÍGENOS (DOS O SEIS LÍNEAS)

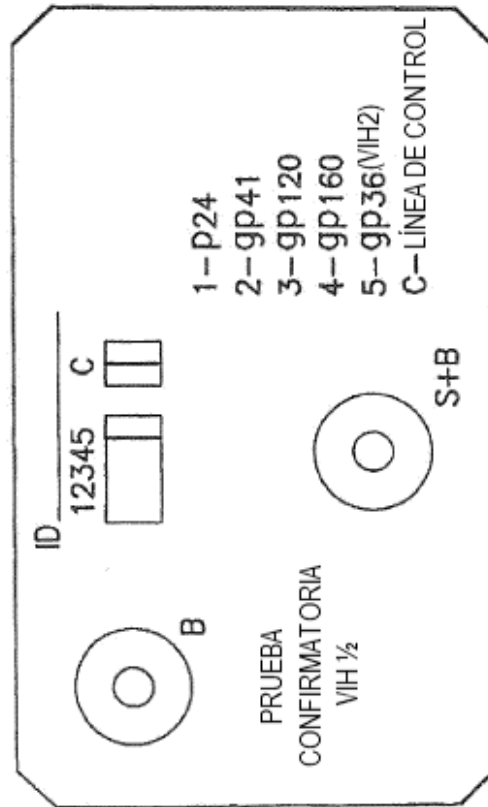


RESULTADO NEGATIVO

FIG.13D

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (DOS O SEIS LÍNEAS)

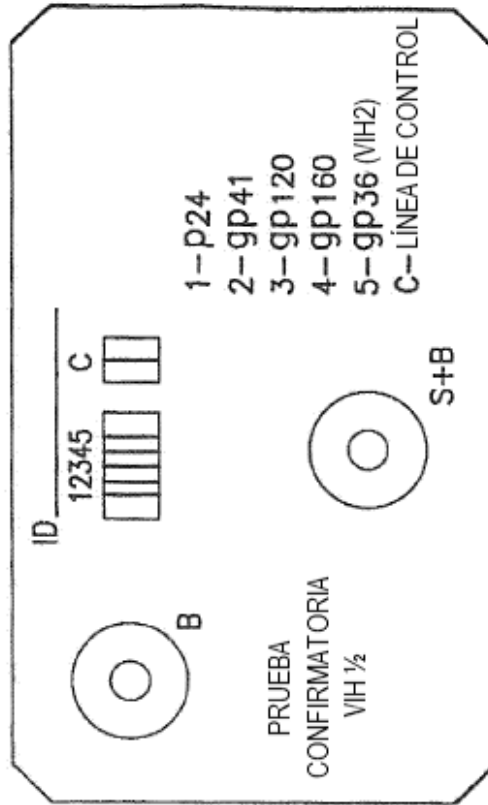


RESULTADO POSITIVO VIH2
(SOLO EL ANTÍGENO VIH2 REACTIVO)

FIG.13F

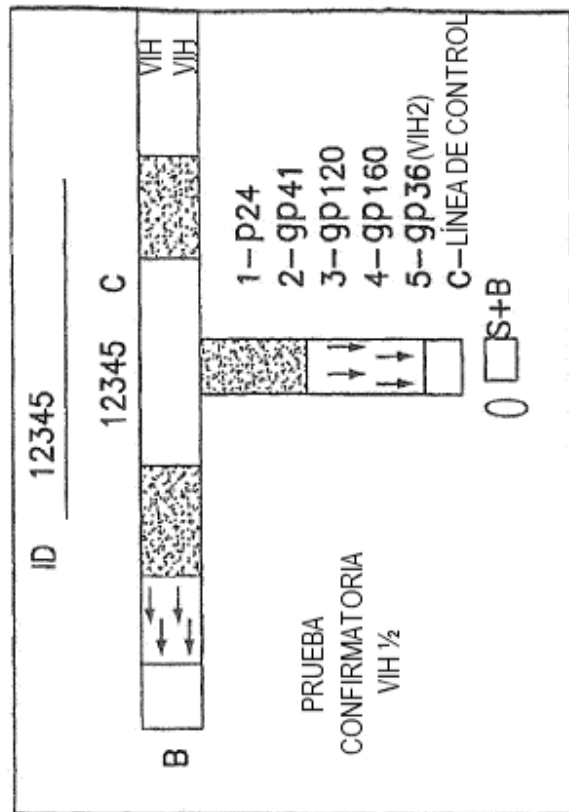
4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (DOS O SEIS LÍNEAS)



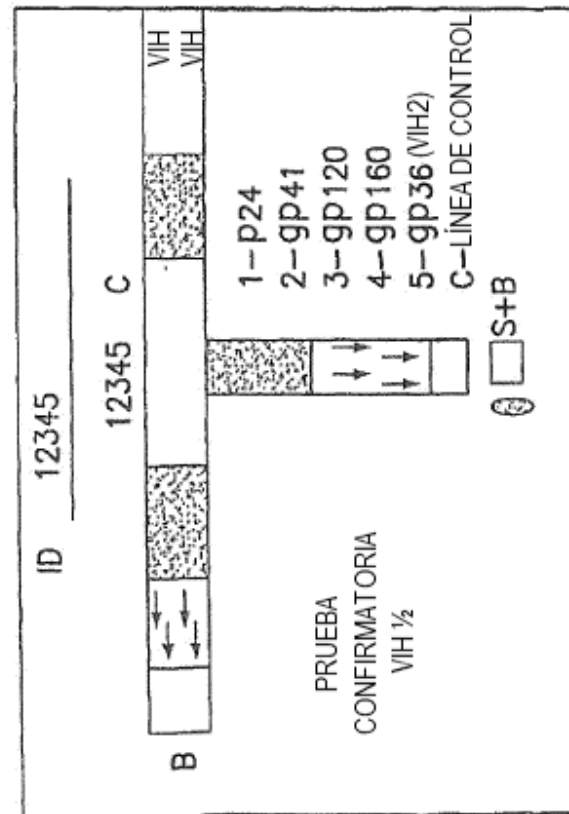
RESULTADO POSITIVO VIH1/2
(AL MENOS DOS ANTÍGENOS DE VIH1 Y EL ANTÍGENO VIH2 TODOS REACTIVOS)

FIG.13G



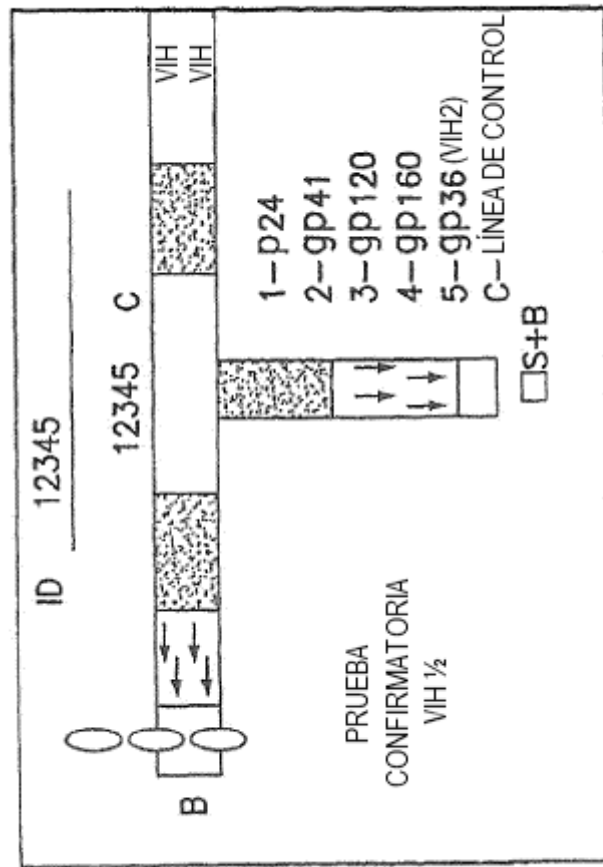
2. AGREGAR 1 GOTTA (30 µl) DE SOLUCIÓN REGULADORA AL POCILLO DE MUESTRA (S+B)

FIG.14B



1. AGREGAR 10 µl DE SUERO/SANGRE AL POCILLO DE MUESTRA (S+B)

FIG.14A

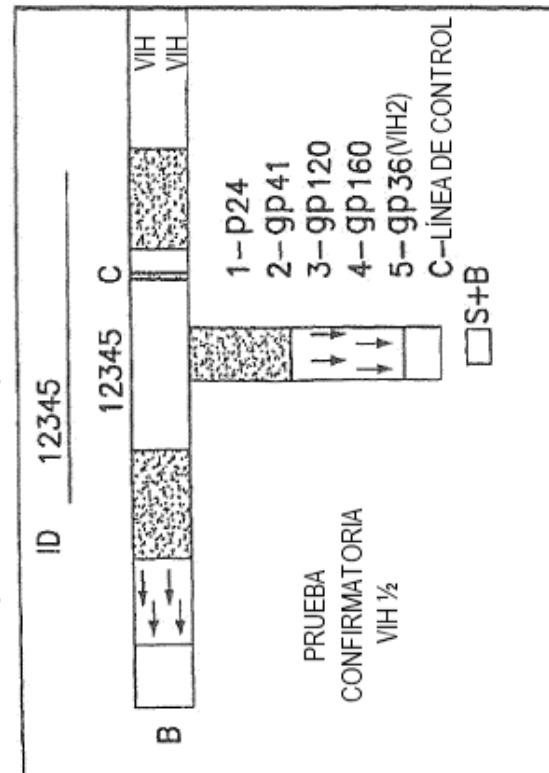


3. AGREGAR 3 GOTAS (90 µl) DE SOLUCIÓN REGULADORA AL POCILLO DE SOLUCIÓN REGULADORA (B) CUANDO LAS LÍNEAS COLOREADAS DESAPARECEN COMPLETAMENTE

FIG.14C

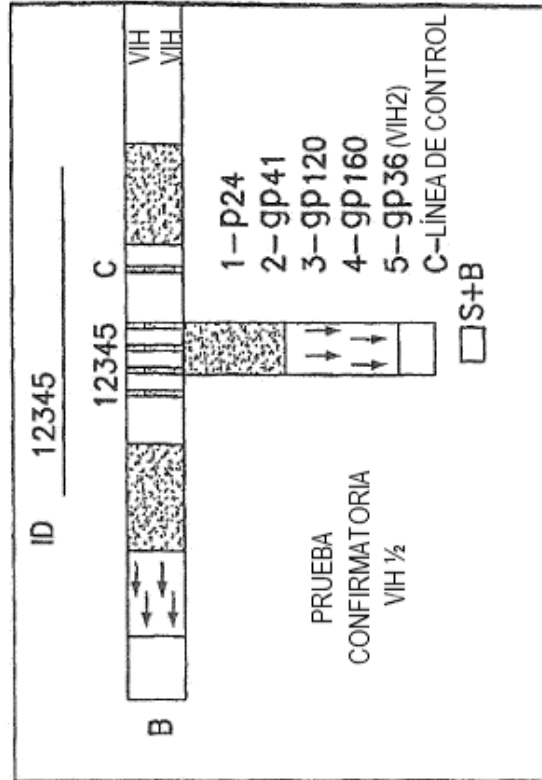
4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (DOS O SEIS LÍNEAS)



RESULTADO NEGATIVO

FIG.14D

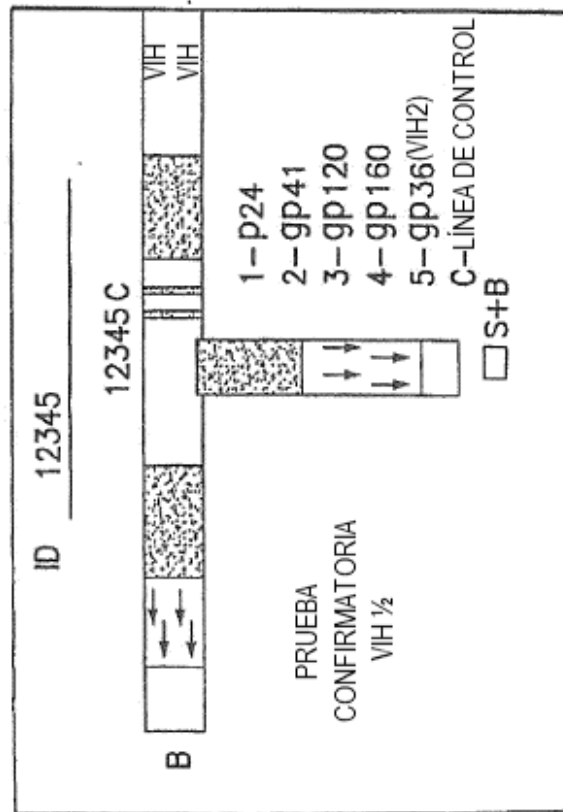


RESULTADO POSITIVO VIH1
(AL MENOS DOS ANTÍGENOS DE VIH1 REACTIVOS)

FIG.14E

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (TRES-SIETE LÍNEAS)



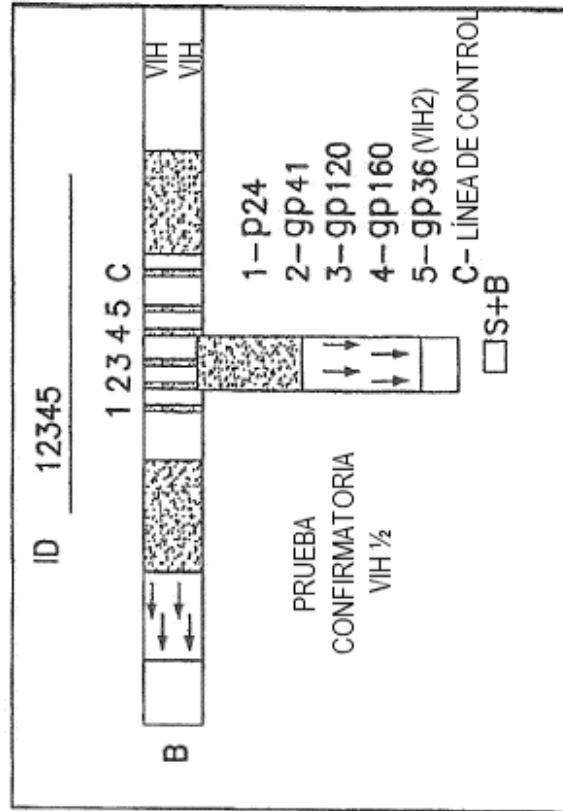
RESULTADO POSITIVO VIH2

(SOLO EL ANTÍGENO VIH2 REACTIVO)

FIG.14F

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

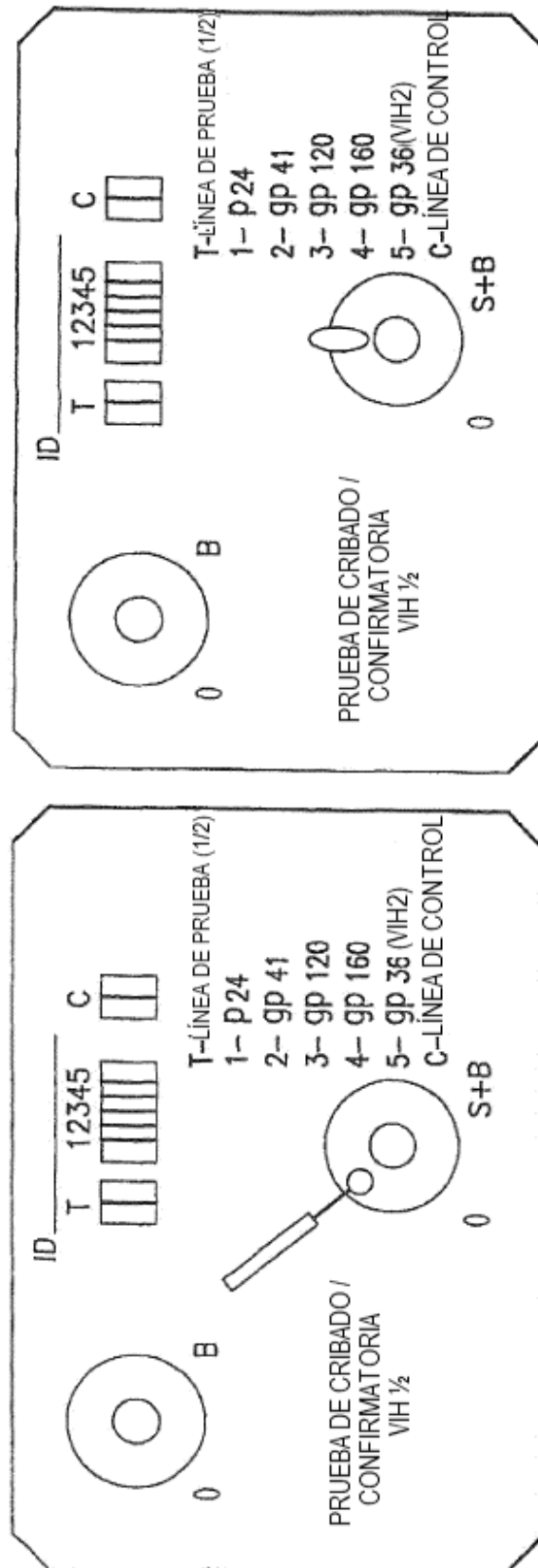
RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (TRES-SIETE LÍNEAS)



RESULTADO POSITIVO VIH1/2

(AL MENOS DOS ANTÍGENOS DE VIH1 Y EL ANTÍGENO VIH2 TODOS REACTIVOS)

FIG.14G

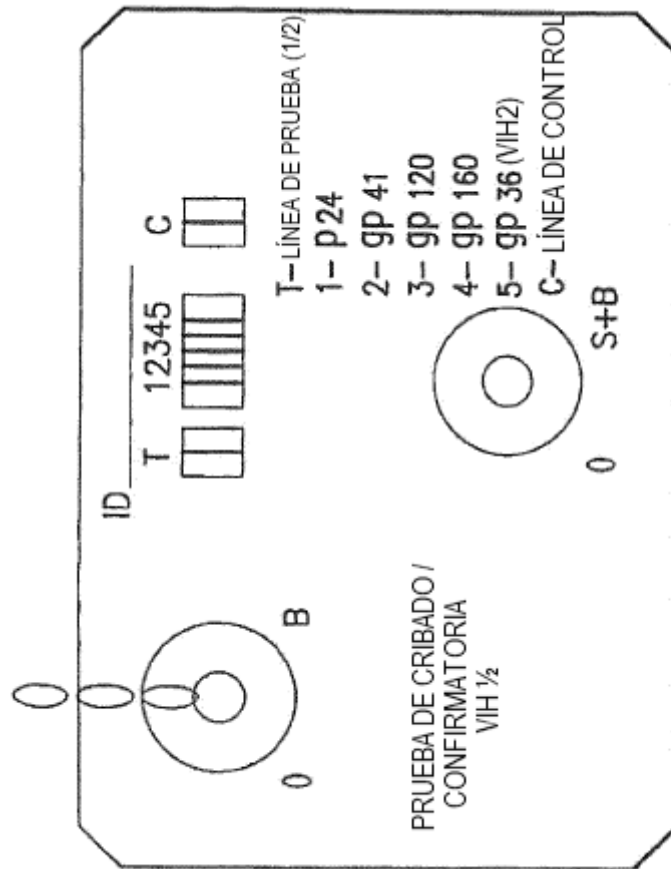


1. AGREGAR 10 µl DE SUERO/SANGRE AL POCILLO DE MUESTRA (S+B)

FIG.15A

1. AGREGAR 1 GOTTA (30 µl) DE SOLUCIÓN REGULADORA AL POCILLO DE MUESTRA (S+B)

FIG.15B

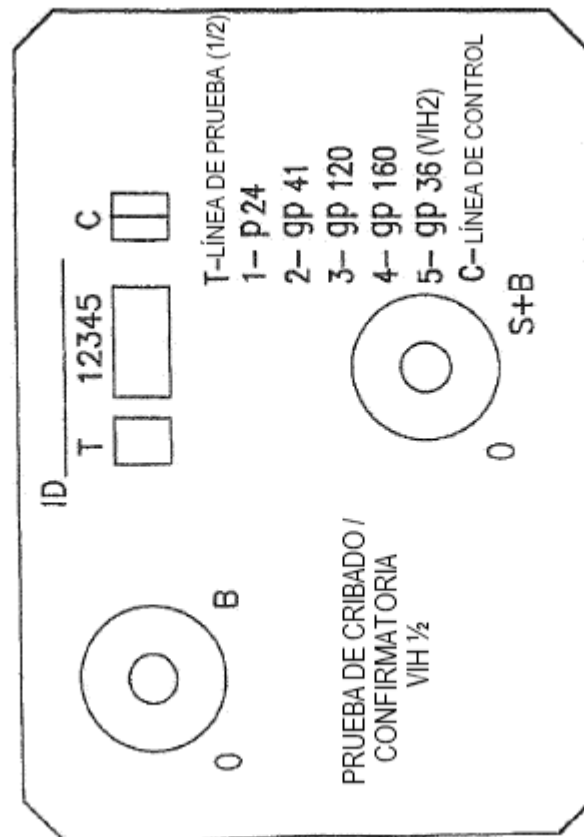


3. AGREGAR 3 GOTAS (90 μ l) DE SOLUCIÓN REGULADORA AL POCILLO DE SOLUCIÓN REGULADORA (B) CUANDO LAS LÍNEAS COLOREADAS DESAPARECEN COMPLETAMENTE

FIG. 15C

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (TRES-SIETE LÍNEAS)

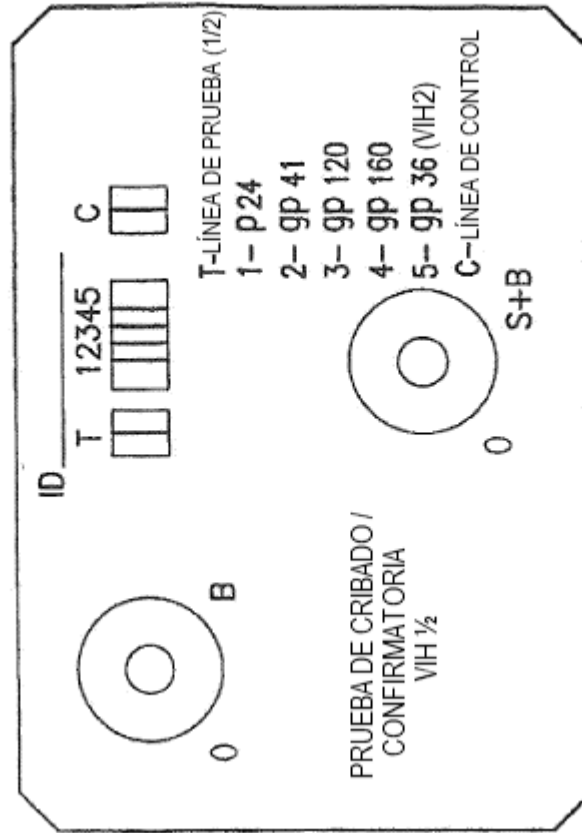


RESULTADO NEGATIVO

FIG. 15D

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (TRES-SIETE LÍNEAS)

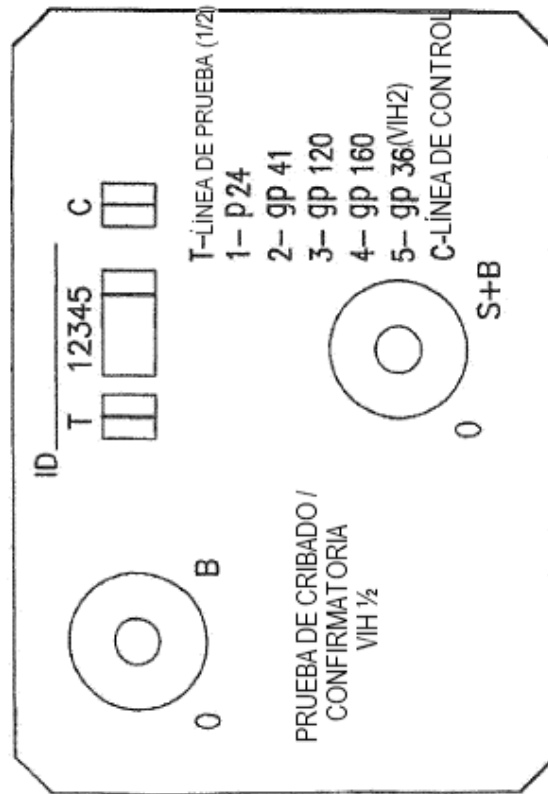


RESULTADO POSITIVO VIH1
(T Y AL MENOS DOS ANTÍGENOS DE VIH1 REACTIVOS)

FIG. 15E

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (TRES-SIETE LÍNEAS)



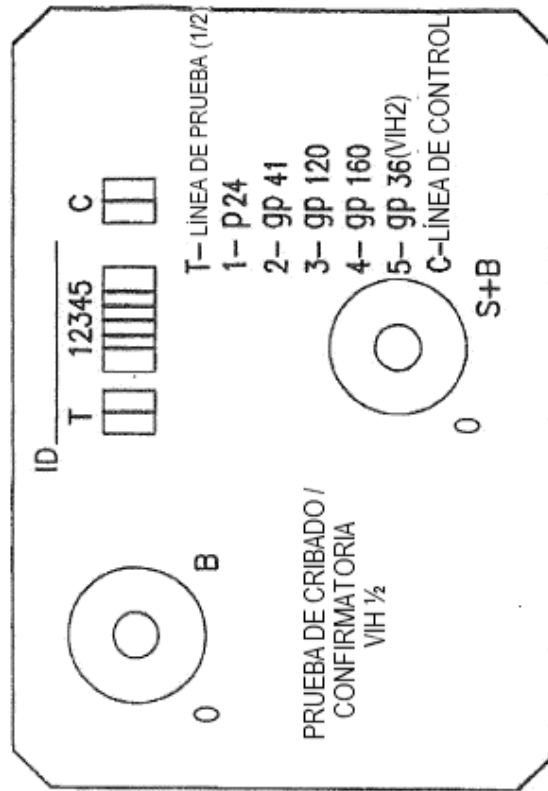
RESULTADO POSITIVO VIH2

(T Y SOLO EL ANTÍGENO DE VIH2 REACTIVOS)

FIG.15F

4. LEER LOS RESULTADOS A 20 MINUTOS

RESULTADO NEGATIVO: UNA LÍNEA O RESULTADO POSITIVO INDICA PRESENCIA DE ANTÍGENO O ANTÍGENOS (TRES-SIETE LÍNEAS)



RESULTADO POSITIVO VIH1/2

(T Y AL MENOS DOS ANTÍGENOS DE VIH1 Y EL ANTÍGENO VIH2 TODOS REACTIVOS)

FIG.15G

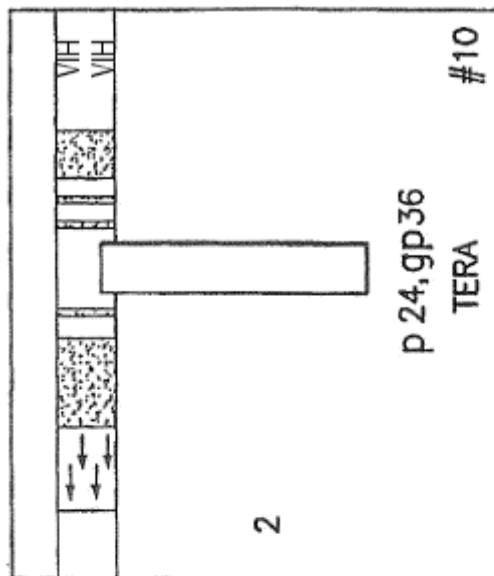


FIG. 16A

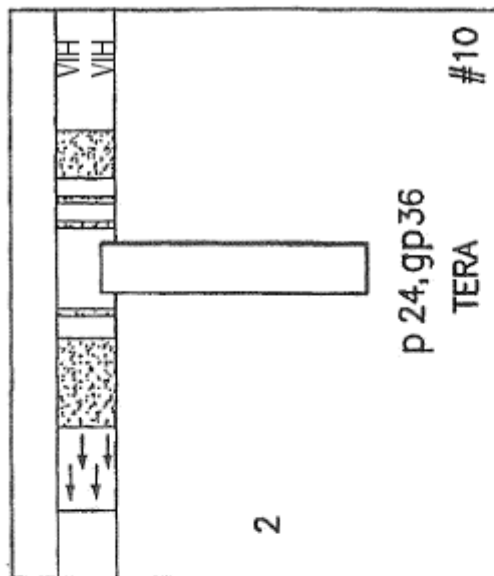


FIG. 16B

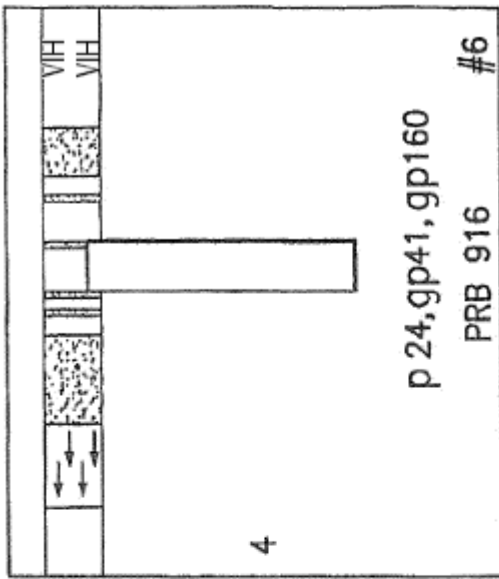


FIG. 16C

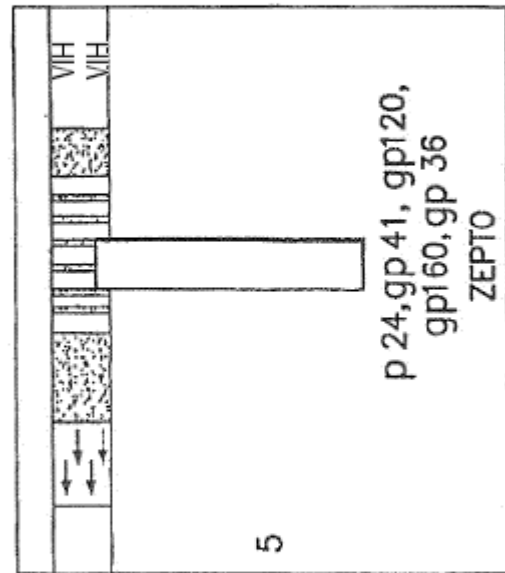


FIG. 16D



FIG. 16E