

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 630**

51 Int. Cl.:

G01N 21/86

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2011** **PCT/EP2011/052613**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011** **WO11104238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011** **E 11704982 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2022** **EP 2539695**

54 Título: **Un método para determinar un rendimiento correcto de la prueba para un elemento de prueba de flujo**

30 Prioridad:

23.02.2010 EP 10001817

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

29.09.2022

73 Titular/es:

B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

ECKHARDT, FLORIAN

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 923 630 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

Un método para determinar un rendimiento correcto de la prueba para un elemento de prueba de flujo

- 5 La invención se refiere a un método para determinar un rendimiento correcto de la prueba para un elemento de prueba de flujo.

Antecedentes de la invención

- 10 Tales métodos se usan para determinar rápidamente la presencia de uno o más marcadores en un pequeño volumen de un fluido corporal. Los métodos y dispositivos conocidos se describen, por ejemplo, en los siguientes documentos: WO 2004/033101 A1, WO 2007/000048 A1, y WO 2009/14360 A1.

- 15 El documento WO 2007/000048 A1 describe un dispositivo del punto de atención que comprende tres o más membranas porosas usadas para detectar uno o más marcadores de una pequeña muestra de fluido útil para identificar marcadores de sangre total. Se describen matrices que comprenden una membrana de primera etapa que es retardante de glóbulos rojos y que contiene un reactivo de detección y una membrana de segunda etapa que tiene una porosidad que es además retardante de glóbulos rojos en comparación con dicha primera etapa con hemólisis mínima de la muestra y una membrana de tercera etapa que tiene una porosidad menor que dicha segunda etapa y que contiene una sonda de captura.

- 20 El documento US 2005/0244986 A1 describe un dispositivo de prueba analítico útil, por ejemplo, en pruebas de embarazo. En funcionamiento, se aplica una muestra líquida al extremo inferior del dispositivo de prueba. Hay zonas funcionales proporcionadas en el dispositivo de prueba. Una zona circular puede actuar como control dando lugar, por ejemplo, a una señal coloreada independientemente de que la muestra líquida aplicada contenga o no el analito a determinar. La determinación del analito tiene lugar en otra zona circular. El usuario puede determinar si el analito está presente en la muestra líquida aplicada al comparar la señal producida en las dos zonas.

- 25 El documento WO 2007/149043 A1 describe un dispositivo de ensayo para realizar un ensayo en una muestra líquida mediante el uso de un conjugado de detección capaz de unirse a un antígeno y que contiene un marcador. El documento US 2009/0253119 A1 se refiere a un ensayo y sistema de flujo lateral, que incluye una tira reactiva, para la detección y cuantificación de analitos en muestras, tales como muestras que contienen células y fluidos.

- 30 El documento EP 1 975 619 A1 proporciona un dispositivo de prueba cromatográfico, que comprende un primer miembro de separación de células sanguíneas, un segundo miembro de separación de células sanguíneas y un soporte cromatográfico dispuesto en este orden desde el lado aguas arriba de la dirección de desarrollo de una muestra.

- 35 El documento EP 1 909 103 A1 describe un analizador y un método de análisis que puede identificar ópticamente el tipo de muestra líquida que se usa en un ensayo de cromatografía. El documento EP 1 909 103 A1 propone usar dicha información para corregir los resultados de la medición al tener en cuenta diferentes factores, que pueden incluir además del tipo de muestra líquida, por ejemplo, la viscosidad del fluido. Con este fin, pueden usarse una pluralidad de fórmulas de corrección o curvas de calibración para obtener una lectura corregida de la sustancia objetivo. El método no describe la determinación de si la muestra para la que se configura el dispositivo está presente.

La Patente de Estados Unidos No. 5,889,585 y el documento US 2007/0231922 A1 describen elementos de flujo de prueba con análisis óptico de una muestra líquida.

- 50 Resumen de la invención

El objeto de la invención es proporcionar un método mejorado para determinar un marcador en un pequeño volumen de una muestra de un fluido corporal, en donde se evita un uso incorrecto de un elemento de prueba de flujo usado para la determinación del marcador.

- 55 Este objeto se resuelve mediante un método para determinar un rendimiento correcto de la prueba para un elemento de prueba de flujo de acuerdo con la reivindicación 1. Los desarrollos ventajosos de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

- 60 En el curso de la determinación óptica pueden medirse uno o más parámetros espectroscópicos seleccionados del siguiente grupo de parámetros espectroscópicos: absorción, fluorescencia, reflexión, remisión y transmisión.

- 65 Una o más de las zonas funcionales del elemento de prueba de flujo pueden proporcionarse con dos o más subzonas funcionales. Por ejemplo, puede ubicarse una pluralidad de subzonas de prueba en el elemento de prueba de flujo.

Al determinar el rendimiento correcto de la prueba, por ejemplo, se evita que se aplique una muestra líquida al elemento de prueba de flujo para el cual el elemento de prueba no se configura. El elemento de prueba de flujo puede configurarse para un fluido corporal y/o un constituyente del fluido corporal. Tal como se usa en la presente descripción, el término "constituyente" debe distinguirse de una sustancia que se añadiría posteriormente al fluido corporal. La sustancia añadida también puede denominarse mezcla o sustancia mezclada. En el caso de un fluido corporal, tal sustancia, por ejemplo, podría añadirse al fluido corporal después de tomarla de un paciente, por ejemplo, podría añadirse un anticuerpo. Por el contrario, el constituyente, tal como se define aquí, es parte del propio fluido corporal. Ejemplos de constituyentes de una muestra de sangre total son el suero sanguíneo y el plasma sanguíneo.

Si, por ejemplo, se aplica una muestra líquida al elemento de prueba de flujo para el cual el elemento de prueba de flujo no se configura, esto conducirá a resultados erróneos. El método propuesto asegura que la determinación del marcador en la muestra líquida se realice correctamente. Esto se debe a que hay una etapa para determinar el rendimiento correcto de la prueba que le brinda al usuario la información de si se proporciona el rendimiento correcto de la prueba, por ejemplo, si se aplicó el líquido correcto al elemento de prueba de flujo.

Preferentemente, la determinación del marcador en la muestra líquida al leer la zona de prueba se realiza mediante la prueba óptica mediante el uso de una o más longitudes de onda de prueba. En una realización preferida, la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba se realiza mediante la determinación óptica mediante el uso de una o más longitudes de onda que son diferentes de la(s) longitud(es) de onda de prueba. Por ejemplo, puede seleccionarse una longitud de onda de fluorescencia y/o absorción que sea diferente de la(s) longitud(es) de onda de prueba.

Tal como se usa en la presente descripción, "conectado de forma fluida" significa que los fluidos, tales como por ejemplo la muestra, pueden pasar desde un compartimento o parte del dispositivo de acuerdo con la presente invención esencialmente sin obstáculos. Tal característica, preferentemente, es independiente de la presencia real de una muestra líquida.

La etapa para determinar el rendimiento correcto de la prueba, especialmente para el uso correcto de la muestra, puede repetirse una o varias veces después de una primera determinación durante el tiempo entre la aplicación del líquido de muestra al elemento de prueba de flujo y la determinación del marcador. Incluso después de la determinación del marcador, pueden realizarse pruebas para el rendimiento correcto de la prueba, preferentemente como una etapa adicional de determinación. La etapa puede realizarse con el fin de determinar el rendimiento correcto de la prueba, especialmente el uso correcto de la muestra, para o en una o más zonas funcionales.

La etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba puede realizarse en una de las zonas funcionales después de que una parte del líquido aplicado alcance la única zona funcional. En este caso, el al menos un parámetro óptico medido para la única zona funcional se compara con uno o más parámetros ópticos predefinidos asignados a la única zona funcional.

En general, como se usa en la presente descripción, "medido para la única zona funcional" significa que el parámetro se midió para caracterizar la única zona funcional. La medición óptica puede realizarse en un área dentro de la única zona funcional y/o en un área ubicada fuera de la única zona funcional.

La zona de prueba o la pluralidad de subzonas de prueba pueden configurarse para la determinación de uno o más marcadores. A continuación se describen ejemplos de marcadores que pueden determinarse mediante el método proporcionado.

La procalcitonina (PCT) se ha convertido en un biomarcador bien establecido para el diagnóstico de sepsis: la PCT refleja la gravedad de la infección bacteriana y se usa en particular para monitorear la progresión de la infección a sepsis, sepsis grave o shock séptico. Es posible usar PCT para medir la actividad de la respuesta inflamatoria sistémica, controlar el éxito de la terapia y estimar el pronóstico (Assicot M y otros: Lancet 1993, 341:515-8; Clec'h C y otros: Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. Crit Care Med 2004;32:1166-9; Lee YJ y otros, Yonsei Med J 2004, 45, 29-37; Meisner M Curr Opin Crit Care 2005, 11, 473-480; Wunder C y otros Inflamm Res 2004, 53, 158-163). El aumento de los niveles de PCT en pacientes con sepsis se correlaciona con la mortalidad (Oberhoffer M y otros Clin Chem Lab Med 1999;37:363-368).

El péptido Adrenomedulina (ADM) se describió por primera vez en 1993 (Kitamura y otros (1993), Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:553-560) como un péptido hipotensor novedoso que comprende 52 aminoácidos, que se habían aislado de un feocromocitoma humano. En el mismo año, también se describió la codificación de cDNA para un péptido precursor que comprende 185 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos completa de este péptido precursor (Kitamura y otros (1993), Biochem. Biophys. Res. Commun. 194:720-725). El péptido precursor, que comprende, entre otros, una secuencia de señal de 21 aminoácidos en el extremo N-terminal, se denomina como "pre-pro-Adrenomedulina" (pre-pro-ADM). El péptido ADM comprende los aminoácidos del 95 al 146 de pre-pro-ADM, a partir del cual se forma por escisión proteolítica. Algunos fragmentos de péptidos de los formados en la escisión del pre-proADM se han caracterizado en detalle, en particular la adrenomedulina (ADM) de péptidos

fisiológicamente activos y "PAMP", un péptido que comprende 20 aminoácidos (22-41) que siguen a los 21 aminoácidos del péptido señal en pre-Pro-ADM. Otro fragmento de función desconocida y alta estabilidad *ex vivo* es la proAdrenomedulina de la región media (MR-proADM) (Struck y otros (2004), *Peptides* 25(8):1369-72), para lo cual se ha desarrollado un método de cuantificación confiable (Morgenthaler y otros (2005), *Clin Chem* 51(10):1823-9). La ADM es un vasodilatador efectivo.

El efecto hipotensor se ha asociado particularmente con segmentos de péptidos en la parte C-terminal de la ADM. Las secuencias de péptidos del extremo N-terminal de la ADM, por otro lado, exhiben efectos hipertensivos (Kitamura y otros (2001), *Peptides* 22, 1713-1718).

La endotelina (ET)-1 es un potente vasoconstrictor endógeno derivado del endotelio (Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T, *J Hypertens Suppl* 1988; 6:S188-91.). ET-1 ejerce sus efectos vasculares mediante la activación de los receptores ET(A) y ET(B) en las células del músculo liso, lo que provoca un aumento en el calcio intracelular (Yanagisawa y otros, *J Hypertens Suppl* 1988;6:S188-91). La endotelina-1 madura se deriva de un precursor más grande denominado Pro-Endotelina-1. ProEndothelin-1 puede procesarse proteolíticamente en varios fragmentos como se describe (Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann *Peptides*. Diciembre de 2005; 26(12):2482-6.). Estos fragmentos están sujetos a degradación proteolítica en la circulación sanguínea, que puede ocurrir de manera rápida o lenta, en dependencia del tipo de fragmento y el tipo y concentración/actividad de las proteasas presentes en la circulación. Un ejemplo de estos fragmentos es la pro-Endotelina-1 C-terminal (CT-proET-1), que puede medirse mediante un inmunoensayo tipo sándwich (Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. *Clin Chem*. junio 2006; 52(6):1144-51.).

Los péptidos natriuréticos tipo B (BNP) son marcadores cuantitativos de insuficiencia cardíaca. El uso del péptido natriurético tipo B (BNP) y su fragmento amino-terminal, el péptido natriurético tipo B pro N-terminal (NT-proBNP) aumenta significativamente la precisión diagnóstica en el ED [Januzzi, J.L., Jr., y otros, *Am J Cardiol*, 2005. 95(8): pág. 948-54; Maisel, A.S., y otros, *N Engl J Med*, 2002. 347(3): pág. 161-7], y de esta manera mejora la evaluación y el tratamiento del paciente [Moe, GW, y otros, *Circulation*, 2007. 115(24): pág. 3103-10; Mueller, C., y otros, *N Engl J Med*, 2004. 350(7): pág. 647-54.]. La concentración de péptido natriurético auricular (ANP) en la circulación es aproximadamente de 50 a 100 veces mayor que la del BNP [Pandey, K.N., *Peptides*, 2005. 26(6): pág. 901-32]. Por lo tanto, la señal biológica reflejada por el aumento de ANP puede ser fisiopatológicamente y, por lo tanto, diagnósticamente incluso más importante que la señal de BNP. A pesar de esto, se sabe poco sobre el rendimiento de diagnóstico de ANP y sus precursores [Cowie, M.R., y otros, *Lancet*, 1997. 350(9088): pág. 1349-53]. El ANP maduro se deriva del precursor N-terminal-proANP (NT-proANP), que es significativamente más estable en la circulación que el péptido maduro y, por lo tanto, se cree que es un analito más confiable [Vesely, D.L., *IUBMB Life*, 2002. 53(3): pág. 153- Pandey, K.N., *Peptides*, 2005. 26(6): pág. 901-32].

El péptido natriurético auricular (ANP), un miembro de la familia de los péptidos natriuréticos, regula varios parámetros fisiológicos, que incluyen la diuresis y la natriuresis, y una presión arterial (BP) más baja. Se produce predominantemente en la aurícula del corazón y comprende el 98 % de los péptidos natriuréticos en la circulación. (Vesely DL. *Life* 2002;53:153-159) el ANP se deriva de la escisión de su pro-hormona precursora, que es significativamente más estable en la circulación que el péptido maduro. Un fragmento de la región media de la hormona precursora (aminoácidos 53-90 de NT-proANP), llamado proANP de la región media (MR-proANP), puede ser relativamente resistente a la degradación por exoproteasas, a diferencia de los epítomos en los terminales N o C de proANP usado en inmunoensayos anteriores. (Morgenthaler NG y otros *Clin Chem* 2004;50:234-236; Gerszten RE y otros *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008).

La mioglobina es una proteína globular de cadena única de 153 aminoácidos, que contiene un grupo prostético hemo (porfirina que contiene hierro) en el centro alrededor del cual se pliega la apoproteína restante. La mioglobina es un marcador sensible de lesión muscular, lo que la convierte en un marcador potencial para ataque cardíaco en pacientes con dolor torácico. (M. Weber, M. Rau, K. Madlener, A. Elsaesser, D. Bankovic, V. Mitrovic y C. Hamm (2005) *Clinical Biochemistry* 38: 1027) La CK-MB y la troponina T cardíaca cTnT se usan en combinación con el ECG y los signos clínicos para diagnosticar el infarto agudo de miocardio (AMI). La troponina cardíaca es un complejo proteico que consta de las tres subunidades T (cTcT), I (cTcl) y C, de las cuales T e I solo se ubican en el tejido muscular térmico y se usan como marcadores con fines diagnósticos (Rottbauer W y otros, *Eur Heart J* 1996;17:3-8).

La arginina vasopresina (AVP), también conocida como vasopresina, argipresina u hormona antidiurética (ADH), es una hormona que se encuentra en la mayoría de los mamíferos, que incluyen los humanos (Caldwell HK, Young WS III (2006). en Lajtha A, Lim R. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neuroactive Proteins and Peptides* (3ra edición ed.). Berlín: Springer. págs. 573-607. ISBN 0-387-30348-0). La vasopresina es una hormona peptídica. Se deriva de un precursor de preprohormona que se sintetiza en el hipotálamo y se almacena en vesículas en la hipófisis posterior. La disminución de la liberación de vasopresina o la disminución de la sensibilidad renal a la vasopresina conduce a la diabetes insípida, una afección que se caracteriza por hipernatremia (aumento de la concentración de sodio en la sangre), poliuria (producción excesiva de orina) y polidipsia (sed).

Como se usa en la presente descripción, términos tales como "determinar (un) marcador(es)" y similares incluyen la detección de la presencia o ausencia y/o la cuantificación de la cantidad y/o concentración del marcador(es) en una muestra. De este modo, la presencia o ausencia debe entenderse en vista de la presencia detectable del marcador, es decir, del límite de detección del ensayo.

Los "marcadores" son sustancias indicativas de condiciones fisiológicas o patológicas. Incluyen, por ejemplo, analitos cardíacos que son proteínas liberadas de las células miocárdicas a la circulación debido al deterioro del tejido cardíaco, hormonas indicativas de embarazo, glucosa usada para monitorear una condición diabética y varias proteínas o toxinas resultantes de infecciones.

En determinadas realizaciones, un marcador es una proteína o un péptido que se va a detectar y/o cuantificar con las matrices, dispositivos, métodos y usos de la presente invención. Esto incluye fragmentos de una longitud de al menos 12 aminoácidos, preferentemente de al menos 15 aminoácidos de dichas proteínas o péptidos. Ejemplos específicos de tales proteínas o péptidos de acuerdo con la presente invención son marcadores asociados con el diagnóstico y/o pronóstico de eventos cardiovasculares tales como mioglobina, troponinas T (cTnT) e I (cTnI), creatinina quinasa MB (CK-MB), FABP, GDF-15, ST-2, procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (CRP), proAdrenomedulina y fragmentos de la misma, que incluye la proadrenomedulina de la región media (MR-proADM), Adrenomedulina, PAMP, proAdrenomedulina C-terminal (CT-proADM), proEndothelin-1 y fragmentos de los mismos que incluyen pro-endothelin-1 C-terminal (CT-proET-1), big-Endothelin-1, Endothelin-1, NT-proEndothelin-1, proANP y fragmentos de los mismos que incluyen péptido natriurético pro-auricular de la región media (MR-proANP), proANP N-terminal (NT-proANP), ANP, proVasopresina y fragmentos de los mismos, que incluye el péptido de proarginina vasopresina C-terminal (CT-proAVP, "copeptina"), vasopresina, neurofina II, proBNP y fragmentos de los mismos que incluyen BNP y proBNP N-terminal (NT-proBNP).

Debe entenderse que las proteínas y/o péptidos marcadores descritos en la presente descripción abarcan como marcadores fragmentos de dichas proteínas y/o péptidos marcadores de al menos 12 aminoácidos, preferentemente de al menos 15 aminoácidos de longitud.

Además, las hormonas asociadas con el embarazo o la ovulación, tal como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona luteinizante (LH), respectivamente, también pueden detectarse mediante el uso de esta invención o varias realizaciones de la misma. También está dentro del alcance de esta invención que otros antígenos para enfermedades tales como el cáncer, específicamente antígenos de cáncer de próstata (antígeno de suero prostático, PSA) también pueden detectarse mediante el uso de esta invención. Las aplicaciones adicionales de esta invención incluyen el reconocimiento de marcadores asociados con infecciones virales tales como hepatitis, infecciones bacterianas y fúngicas que incluyen *Helicobacter pylori* para úlceras gastrointestinales, otras infecciones causadas por *Bacillus anthracis*, *Pediculus humanis*, *Siphonaptera* y bacterias gram positivas como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus faecalis* son todos ejemplos no limitativos. Esta invención también puede ser útil para detectar drogas, que incluyen las drogas de abuso. La presente invención también contempla ensayos enzimáticos tales como los que determinan los niveles de glucosa y en sangre. Se reconocerá que el uso de los dispositivos no se limita a estos marcadores específicos o, de hecho, a la sangre total, sino que es igualmente aplicable a otros procedimientos analíticos tales como los mencionados anteriormente.

La etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de determinar el uso correcto de la muestra al determinar ópticamente si la muestra líquida aplicada es un fluido corporal o un constituyente del fluido corporal, el elemento de prueba de flujo se configura para la determinación del marcador en el fluido corporal o el constituyente del fluido corporal.

De acuerdo con una realización preferida, el método comprende además las etapas de aplicar un pequeño volumen de una muestra de sangre total y determinar ópticamente si la muestra de sangre total es sangre no hemolizada o hemolizada. En una realización preferida, la determinación óptica comprende una etapa de medir una señal de remisión para la luz irradiada en un área de interés en el elemento de prueba de flujo. La señal de remisión medida puede compararse con una señal de referencia para determinar si está presente sangre no hemolizada o hemolizada. Como se usa en la presente descripción, "muestra de sangre total" especifica una muestra de sangre sin procesar o esencialmente sin procesar.

La etapa de medir comprende una etapa de medir ópticamente un área conectada de forma fluida y ubicada entre la zona de prueba y la zona de control. Debido a que el área investigada en este caso se ubica aguas abajo de la zona de prueba, la medición óptica brinda información sobre la parte de la muestra líquida que entró antes en la zona de prueba.

La etapa de proporcionar el elemento de prueba de flujo comprende una etapa de proporcionar un elemento de prueba de flujo que tiene una zona de puente ubicada entre y conectada de forma fluida a la zona de aplicación y la zona de prueba, y una zona de control ubicada aguas arriba y conectada de forma fluida a la zona de prueba. La zona de puente se proporciona por una membrana de puente conectada de forma fluida a la zona de aplicación y la zona de prueba. La membrana de puente puede tener una dimensión pura promedio de 8,0 μm $\pm$ 2 μm y un flujo capilar para suero o plasma a una distancia de 2 cm de menos de 30 segundos y/o a una distancia de 4 cm de

menos de 180 segundos, en donde el flujo capilar para suero o plasma en la membrana de puente es menor que en el primer material poroso y mayor que en la zona de prueba. Además, la zona de prueba y la zona de control pueden implementarse mediante una o más membranas. Preferentemente, las membranas se fabrican de un material poroso.

La etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de medir ópticamente al menos una de las zonas funcionales seleccionadas del siguiente grupo de zonas funcionales: la zona de aplicación, la zona de puente, la zona de detección y la zona de control.

En una realización adicional, la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de medir ópticamente un área del elemento de prueba de flujo ubicada fuera de la pluralidad de zonas funcionales. Tal medición puede realizarse como alternativa o además de la medición dentro de una de las zonas funcionales. Por ejemplo, la medición óptica puede realizarse para áreas del elemento de prueba de flujo ubicadas entre dos de las zonas funcionales. Puede realizarse una medición óptica con respecto al líquido correcto en una de las zonas funcionales para un área ubicada aguas arriba y/o aguas abajo de una zona funcional de interés.

En una realización preferida, el método comprende además las etapas de aplicar un pequeño volumen de una muestra de sangre total y determinar ópticamente la fuga de eritrocitos en un área de interés en el elemento de prueba de flujo. Si, por ejemplo, debe determinarse un marcador en una muestra de sangre total, generalmente se necesita evitar que los eritrocitos se filtren en la propia zona de prueba. Mediante la realización anterior puede comprobarse si se produjo o no tal fuga. Si la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba indica que ocurrió tal fuga, esto le brinda la información al usuario de que los resultados de la medición recopilados en esas circunstancias pueden no ser correctos. De acuerdo con una realización adicional, la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de realizar una pluralidad de mediciones ópticas en diferentes momentos. La pluralidad de mediciones ópticas puede realizarse para la misma área o diferentes áreas de interés en el elemento de prueba de flujo.

En otra realización, la etapa de determinar el marcador en la muestra de sangre total comprende al menos una de las siguientes etapas: determinar la presencia del marcador en la muestra de sangre total y determinar la concentración del marcador en la muestra de sangre total,

La etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de determinar ópticamente si la muestra líquida aplicada es una muestra de sangre total.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para determinar un rendimiento correcto de la prueba para un elemento de prueba de flujo, el método que comprende las etapas de:

- proporcionar un elemento de prueba de flujo que tiene una pluralidad de zonas funcionales, la pluralidad de zonas funcionales al menos se conecta parcialmente de forma fluida y comprende una zona de aplicación y una zona de prueba conectada de forma fluida a la zona de aplicación y configurada para la determinación de un marcador en una muestra de sangre total, una zona de puente ubicada entre y conectada de forma fluida a la zona de aplicación y la zona de prueba, y una zona de control ubicada aguas abajo y conectada de forma fluida a la zona de prueba, en donde la zona de puente comprende una membrana de puente conectada de forma fluida a la zona de aplicación y la zona de prueba configurada para dificultar la migración de eritrocitos a la zona de prueba,
- aplicar un pequeño volumen de una muestra líquida a la zona de aplicación de muestra del elemento de prueba de flujo, de modo que la muestra líquida fluya al menos parcialmente a la zona de prueba y a la zona de control, y
- determinar un rendimiento correcto de la prueba para el elemento de prueba de flujo al medir al menos un parámetro óptico para la una o más zonas funcionales, y comparar el al menos un parámetro óptico medido con al menos un parámetro óptico predefinido asignado a la una o más zonas funcionales que de esta manera determina ópticamente si una parte de la muestra líquida aplicada que llega a una de las zonas de la pluralidad de zonas funcionales es una muestra de sangre total y, opcionalmente, determinar el marcador en la muestra de sangre total al leer la zona de prueba, si se determina el rendimiento correcto de la prueba.

Si en la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba se detecta un rendimiento incorrecto de la prueba, se proporciona que el sistema de análisis interrumpa el análisis adicional. Por ejemplo, el sistema de análisis puede bloquearse en cuanto al uso adicional del elemento de prueba de flujo al que se aplicó la muestra líquida. En una realización preferida, se presenta una señal de advertencia al usuario del sistema de análisis. La señal de advertencia puede comprender al menos una de una señal acústica y una señal de video.

Descripción de realizaciones preferidas de la invención

A continuación, la invención se describirá con detalle adicional a modo de ejemplo con referencia a diferentes realizaciones. En las figuras,

La Figura 1 muestra una representación esquemática de un elemento de prueba de flujo en una vista superior, y
 La Figura 2 muestra señales de remisión espectroscópicas (unidades relativas) en dependencia de la posición a lo largo de un elemento de prueba de flujo (unidades relativas) proporcionado con una muestra de sangre total en diferentes tiempos de incubación.

Los siguientes ejemplos se describen únicamente con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se contemplan cambios en la forma y sustitución de equivalentes según las circunstancias lo puedan sugerir o lo hagan conveniente. Aunque se han empleado términos específicos en la presente descripción, tales términos se pretenden en un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

La Figura 1 muestra esquemáticamente un elemento de prueba de flujo en una vista superior. El elemento de prueba de flujo, que también puede denominarse dispositivo del punto de atención, comprende un cuerpo de dispositivo 1 que recibe un cuerpo de membrana 2 en el que se implementan una pluralidad de zonas funcionales. Las zonas funcionales conectadas de forma fluida comprenden las siguientes zonas: zona de aplicación 3, zona de puente 4, zona de prueba 5 y zona de control 6.

Una prueba de "punto de atención" (POC) se define como cualquier prueba de diagnóstico realizada en o cerca del sitio de atención del paciente (Kost, Goals, guidelines and principles for point-of-care testing. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins. 2002, Capítulo 1, págs. 3-12). Al acercar el análisis al paciente, se han eliminado varias etapas del proceso, lo que facilita un tiempo más corto para obtener resultados y una respuesta de gestión más rápida con mejores resultados. Las ventajas de las pruebas POC son tiempos de respuesta (TAT) más rápidos, decisiones médicas más rápidas, prevención de transporte de muestras largas y la necesidad de solo pequeños volúmenes de muestras (Heinschink y otros, Point-of-care testing. Laboratoriums Medizin 2002. 26 (1-2): 61-67.)

La zona de aplicación 3 se configura para recibir un pequeño volumen de un fluido corporal que luego, al menos parcialmente, fluirá en el cuerpo de la membrana 2 hacia la zona de prueba 5 y la zona de control 6, respectivamente. Como se usa en la presente descripción, "zona de aplicación de muestra" especifica una parte del dispositivo donde se aplica la muestra, que puede ser, por ejemplo, al sumergir la zona de aplicación de muestra en la muestra o al aplicar la muestra con un medio de transferencia de muestra tal como una jeringa o pipeta. La zona de aplicación de la muestra es, por lo tanto, una abertura en el dispositivo que puede tener, por ejemplo, la forma de un bolsillo o muesca a través de la cual puede aplicarse la muestra al primer material poroso.

El flujo tiene lugar a lo largo de un canal de flujo de muestra formado entre la zona de aplicación 3 y la zona de control 5. El cuerpo de membrana 2 puede proporcionarse con uno o más elementos de membrana que, en una realización, se proporcionan en una pila de membranas. Los canales de flujo proporcionados por el material de la membrana porosa tienen dimensiones que permiten el flujo capilar.

En una realización, la zona de prueba 4 se configura para la determinación de la presencia de un marcador en una muestra de sangre total. El elemento de prueba de flujo puede usarse como sigue.

Como es fácilmente evidente, al entrar en contacto con un primer material poroso proporcionado dentro y/o adyacente a la zona de aplicación 3, los glóbulos rojos de la muestra aplicada comenzarán a separarse del plasma y en el curso de su flujo el marcador encontrará un reactivo de detección, típicamente, pero no limitado a, un anticuerpo marcado dirigido a un epítipo del marcador para formar un complejo reactivo de detección de marcador. En la realización descrita, el complejo reactivo de detección de marcador se mueve luego a la zona de puente 4 proporcionada por la membrana de puente, donde la migración de glóbulos rojos además se dificultará/retardará. El complejo reactivo de detección de marcador luego se mueve hacia la zona de prueba 5 proporcionada por una membrana de prueba y encuentra una sonda de captura inmovilizada, típicamente pero no limitada a un anticuerpo dirigido a un epítipo separado del marcador o a un epítipo del reactivo de detección. La reacción del complejo reactivo de detección de marcador con las sondas de captura inmovilizadas forma un punto de captura concentrado visible a simple vista o con la instrumentación adecuada. La zona de control opcional 6 aguas abajo del punto de captura en la zona de prueba 5 contendrá el reactivo de control. En realizaciones preferidas, el reactivo de control puede ser una IgG anti-animal. Alternativamente, en lugar de la zona de control 6, las variaciones en la longitud de la cinta de cubierta transparente sobre las membranas del dispositivo de prueba pueden provocar que la muestra, cuando llegue al extremo de la membrana de prueba, se evapore de manera controlada, lo que revela una señal fácilmente detectable.

Está dentro del alcance de la presente invención detectar un marcador o incluso múltiples marcadores en la muestra de fluido al mismo tiempo. En consecuencia, los expertos en la técnica apreciarán que pueden depositarse uno o más reactivos de detección y/o una o más sondas de captura en el dispositivo del punto de atención de la presente invención.

En principio, el ensayo, es decir, la combinación de reactivo de detección y sonda de captura usada para la detección del marcador puede basarse en cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Los ensayos pueden ser ensayos no competitivos, es decir, ensayos de tipo sándwich o ensayos competitivos (The Immunoassay

Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ra ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C y otros Curr Opin Chem Biol. febrero de 2006;10(1):4-10. PMID: 16376134).

Como se usa en la presente descripción, una sonda de captura puede seleccionarse del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de PNA, un aptómero, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína preferentemente un anticuerpo.

Puede utilizarse cualquiera de una variedad de marcado de sondas de captura y sistemas de detección correspondientes en el dispositivo de prueba disponible para el experto en la técnica. Los marcadores conocidos incluyen, pero no se limitan a, marcadores de metal, fluorescencia, electroquimioluminiscencia y enzimas. Los marcadores de metal especialmente se prefieren debido a su notable sensibilidad. Entre los metales, el oro es el más preferido principalmente porque se emplea ampliamente para este tipo de reacción y sus características se conocen bien.

En determinadas realizaciones, el primer material poroso comprende conjugados de anticuerpo y partículas de oro que se unen al marcador que se va a determinar en la muestra de sangre total. Debe entenderse por la presente que los conjugados de anticuerpo y partículas de oro se ubican como tales en el primer material poroso y que los conjugados de anticuerpo y partículas de oro al entrar en contacto con la muestra se suspenderán en la muestra y se transportarán junto con la muestra. Por tanto, es evidente que los conjugados de anticuerpo y partículas de oro no pueden inmovilizarse de forma irreversible en el primer material poroso. Sin embargo, en ciertas realizaciones puede implementarse una inmovilización de los conjugados de anticuerpo y partículas de oro en el primer material poroso, que es reversible al entrar en contacto con la muestra, por ejemplo, que es susceptible a la hidrólisis.

El tamaño de partícula preferido para los anticuerpos marcados con oro empleados es de aproximadamente 20 a 65 nm, aunque puede tolerarse una variación apreciable en dependencia de factores bien conocidos, tales como el corte clínico del marcador y la afinidad de los reactivos. Además, una señal de oro puede mejorarse para volverse fácilmente visible mediante el uso de sal de plata reducible que se deposita como producto visible. Una sal reactiva típica es el lactato de plata, que sirve como fuente de iones de plata reducibles, que emplea hidroquinona como agente reductor. La plata metálica forma un depósito negro fácilmente discernible alrededor de cada partícula de oro. Alternativamente, si se emplea un marcador de enzima tal como la peroxidasa de rábano picante, la reacción puede detectarse mediante la adición de peróxido de hidrógeno y un colorante tal como CIS orto fenilendiamina de acuerdo con los procedimientos estándares. Los marcadores adicionales que pueden usarse bien dentro del alcance de esta invención son los marcadores paramagnéticos como se describe en la Patente de Estados Unidos 6,046,585 que permiten una sensibilidad aún mayor para la detección de marcadores.

En el contexto de la presente solicitud, "reactivo de detección" es un material, a menudo un anticuerpo al marcador, que se va a detectar en la muestra líquida. En ciertas realizaciones, se une de forma liberable al primer soporte de material poroso en el punto de aplicación de la muestra líquida o aguas abajo del mismo. Para la mayoría de los análisis inmunoquímicos, se marca con un marcador detectable tal como el oro coloidal y forma un complejo con el marcador a determinar.

En el contexto del flujo capilar de suero de la membrana de puente, el término "variación horizontal" especifica una variación del caudal en la dirección del flujo del suero.

Como se usa en la presente descripción, "separar el suero de las células sanguíneas" significa que las células sanguíneas, en particular los glóbulos rojos, se retienen, mientras que el suero pasa al compartimento adyacente o parte del dispositivo, como por ejemplo tal como a la siguiente membrana. Por la presente, se retiene preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 %, incluso más preferentemente al menos el 99,5 %, con mayor preferencia alrededor del 100 % de los glóbulos rojos.

El método para determinar la presencia de un marcador en un fluido corporal descrito con referencia a las realizaciones no limitativas anteriores comprende una etapa de determinar el uso correcto de la muestra. Esto se realiza mediante (una) medición(es) espectroscópica(s). Se detectan y analizan uno o más parámetros espectroscópicos seleccionados del grupo que comprende absorción, fluorescencia, transmisión, reflexión y remisión para determinar si una parte de una muestra líquida aplicada a la zona de aplicación 3 y que alcanza una de las zonas funcionales en el elemento de prueba de flujo es uno de los fluidos corporales para los que se configura el elemento de prueba de flujo y un constituyente del fluido corporal. Preferentemente, el área 6 se investiga ópticamente para la determinación del uso correcto de la muestra. Por ejemplo, un área 7 ubicada entre la zona de prueba 5 y la zona de control 6 puede investigarse ópticamente para la determinación de qué tipo de muestra líquida alcanzó la zona de prueba 5 y/o la zona de control 6. Por ejemplo, puede analizarse la remisión de parámetros ópticos para el área 7.

En una realización preferida, el método descrito anteriormente comprende las etapas de aplicar un pequeño volumen de una muestra de sangre total y determinar ópticamente la fuga de eritrocitos en un área de interés en el elemento de prueba de flujo. Si, por ejemplo, debe determinarse un marcador en una muestra de sangre total, generalmente se necesita evitar que los eritrocitos se filtren en la propia zona de prueba 5. Mediante la realización

anterior puede comprobarse si se produjo o no tal fuga. Si la etapa de determinar el uso correcto de la muestra indica que se produjo tal fuga, esto le brinda la información al usuario de que los resultados de la medición recopilados en esas circunstancias pueden no ser correctos,

- 5 La Figura 2 muestra señales de remisión espectroscópica (unidades relativas) en dependencia de la posición relativa en el elemento de prueba de flujo 1 (unidades relativas) proporcionado con una muestra de sangre total en diferentes tiempos de incubación. El elemento de prueba de flujo 1 (ver Figura 1) se escanea de izquierda a derecha lo que cubre al menos la zona de control 6, el área 7 y la zona de prueba 5. En el lado izquierdo, la llamada banda de control asignada a la señal de remisión en la zona de control 6 no cambia con el tiempo. Un aumento de la señal de remisión en el lado derecho indica una fuga de eritrocitos en la zona de prueba 5 en el elemento de prueba de flujo 1.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un rendimiento correcto de la prueba para un elemento de prueba de flujo, el método que comprende las etapas de:
 - 5
 - proporcionar un elemento de prueba de flujo que tiene una pluralidad de zonas funcionales (3, 4, 5, 6, 7), la pluralidad de zonas funcionales (3, 4, 5, 6, 7) se conecta al menos parcialmente de forma fluida y comprende una zona de aplicación (3), una zona de prueba (5) conectada de forma fluida a la zona de aplicación (3) y configurada para la determinación de un marcador en una muestra de sangre total,
 - 10 una zona de puente (4) ubicada entre y conectada de forma fluida a la zona de aplicación (3) y la zona de prueba (5), y una zona de control (6) ubicada aguas abajo y conectada de forma fluida a la zona de prueba (5), en donde la zona de puente (4) comprende una membrana de puente conectada de forma fluida a la zona de aplicación (3) y la zona de prueba (5) configurada para dificultar la migración de eritrocitos a la zona de prueba (5),
 - 15 ▪ aplicar un pequeño volumen de una muestra líquida a la zona de aplicación de muestra (3) del elemento de prueba de flujo, de modo que la muestra líquida fluya al menos parcialmente a la zona de prueba (5) y a la zona de control (6), y
 - 20 ▪ determinar el rendimiento correcto de la prueba para el elemento de prueba de flujo al medir al menos un parámetro óptico para una o más zonas funcionales (3; 4; 5; 6; 7), y comparar el al menos un parámetro óptico medido con al menos un parámetro óptico predefinido asignado a la una o más zonas funcionales (3; 4; 5; 6; 7), que de esta manera determina ópticamente si una parte de la muestra líquida aplicada que llega a una de las zonas de la pluralidad de zonas funcionales (3, 4, 5, 6, 7) es una muestra de sangre total,
 - 25 y, opcionalmente, determinar el marcador en la muestra de sangre total al leer la zona de prueba (5), si se determina el rendimiento correcto de la prueba, en donde si en la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba se detecta un rendimiento incorrecto de la prueba, se interrumpe el análisis adicional.
 - 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el método que comprende además, la etapa: determinar ópticamente si una parte de la muestra de sangre total que llega a la zona de prueba (5) es sangre no hemolizada o hemolizada.
 - 35 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa de medir comprende una etapa de medir ópticamente un área conectada de forma fluida y ubicada entre la zona de prueba (5) y la zona de control (6).
 - 40 4. El método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de medir ópticamente al menos una de las zonas funcionales (3, 4, 5, 6, 7) seleccionada del siguiente grupo de zonas funcionales: la zona de aplicación (3), la zona de puente (4), la zona de detección (5) y la zona de control (6).
 - 45 5. El método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de medir ópticamente un área del elemento de prueba de flujo ubicada fuera de la pluralidad de zonas funcionales (3, 4, 5, 6, 7).
 - 50 6. El método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, el método que comprende además: determinar ópticamente la fuga de eritrocitos en un área de interés en el elemento de prueba de flujo.
 - 55 7. El método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de determinar el rendimiento correcto de la prueba comprende una etapa de realizar una pluralidad de mediciones ópticas en diferentes momentos.
 8. El método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de determinar el marcador en la muestra de sangre total comprende al menos una de las siguientes etapas:
 - determinar la presencia del marcador en la muestra de sangre total, y
 - determinar la concentración del marcador en la muestra de sangre total.

Figura 1

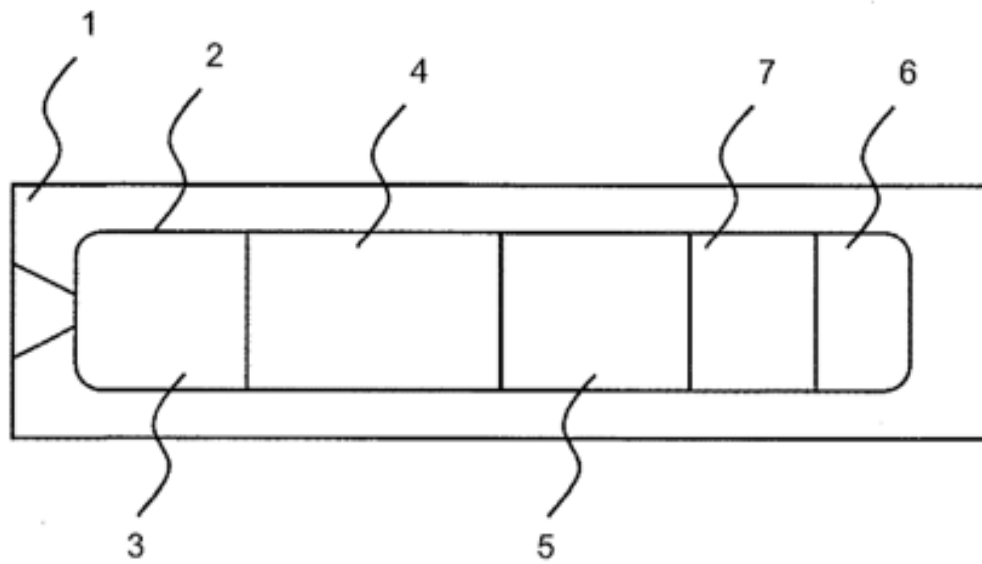


Figura 2

Paciente 3_Prueba _en_Blanco 1

