

INMUNOENSAYO QUE UTILIZA UN CONJUGADO DE CAPTURA
ANTECEDENTES

REFERENCIA CRUZADA CON UNA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de EUA con No de
5 Serie 61/974,060, presentada el 2 de abril de 2014.

1. Patentes Relacionadas

[0001] Esta solicitud se relaciona con las Patentes de EUA en copropiedad Nos.
7,189,522, 7,682,801, 7,879,597, 8,507,259 y 8,603,835 cuya totalidad se incorpora por la
presente por su referencia en el presente documento en sus totalidades.

10 2. Campo

[0002] La divulgación objeto se relaciona ampliamente con métodos y dispositivos
de inmunoensayo. De manera más particular, la divulgación objeto se relaciona con la
detección de uno o más ligandos particulares en un fluido corporal, que posiblemente
contiene ligandos relacionados adicionales.

15 3. Estado de la Técnica

[0003] Muchos tipos de ensayos ligando-receptor se han utilizado para detectar la
presencia de diversas sustancias, a menudo denominadas por lo general ligandos, en
fluidos corporales tales como sangre, orina o saliva. Estos ensayos implican reacciones
antígeno-anticuerpo, conjugados sintéticos que comprenden etiquetas solubles
20 radioactivas, enzimáticas, fluorescentes u observable en forma visual de poliestireno o
metal, y cámaras reactivas especialmente diseñadas. En todos estos ensayos, hay un
receptor, por ejemplo, un anticuerpo, el cual 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 ligando-receptor. Algunas pruebas se diseñan para hacer unas
25 determinación cuantitativa pero, en muchas circunstancias, todo lo que se requiere es una
indicación cualitativa positiva/negativa. Ejemplos de estos ensayos cualitativos incluyen

tipado de sangre, la mayor parte de los tipos de análisis de orina, pruebas de embarazo y pruebas de SIDA. Para estas pruebas, se prefiere un indicador observable en forma visual, tal como la presencia de aglutinación o un cambio de color.

[0004] Las Patentes de EUA en copropiedad Nos. 7,189,522, 7,682,801, 7,879,597 y 8,507,259 se dirigen a ensayos de detección rápidos y mejorados al utilizar un dispositivo de flujo lateral “de trayectoria dual”. De manera más particular, el dispositivo de inmunoensayo se dota de una primera tira absorbente que proporciona una primera trayectoria de flujo lateral u horizontal para un conjugado, y una segunda tira absorbente que proporciona una segunda trayectoria de flujo lateral u horizontal para una muestra. Un sitio de prueba, que tiene un mecanismo de unión a un ligando inmovilizado, se ubica sobre o por lo menos en una de las tiras, y las tiras se tocan entre sí en el sitio de prueba. Al utilizarse, la muestra y una solución reguladora se proporcionan primero a la segunda tira absorbente, y fluyen con el paso del tiempo al sitio de prueba a lo largo de la segunda trayectoria de flujo (es decir, no mojan inmediatamente el sitio de prueba). Si la muestra contiene el ligando de interés, el ligando se captura en el sitio de prueba por el mecanismo de unión a ligando inmovilizado. La solución reguladora, proporcionada a la primera tira absorbente, lleva el conjugado hacia el sitio de prueba después de que la muestra ha alcanzado el sitio de prueba. Si el ligando se captura en el sitio de prueba, el conjugado se une al ligando capturado y proporciona una indicación de un resultado de prueba “positivo”, es decir, el ligando de interés estaba presente en la muestra. Si el ligando no se captura en el sitio de prueba, el conjugado no se une y se obtiene un resultado de prueba “negativo”, es decir, el ligando de interés no estaba presente en la muestra. Una línea de control que captura conjugado puede proporcionarse cerca del sitio de prueba, para confirmar que la prueba se condujo apropiadamente. Al proporcionar trayectorias de flujo separadas para la muestra y el conjugado, se obtiene una sensibilidad y selectividad sustancialmente superiores en relación con los dispositivos estándar de flujo lateral y

dispositivos de flujo inverso que utilizan tiras individuales.

[0005] También se ha comprobado que los dispositivos de trayectoria dual son robustos en proporcionar resultados sensibles exactos, en casos donde el sitio de prueba se dota de múltiples mecanismos diferentes de unión a ligando inmovilizado, es decir, capacidades múltiples. Por ejemplo, líneas de prueba separadas en un solo dispositivo OPP se han proporcionado para detectar, por separado y con exactitud, VIH-1, VIH-2 y sífilis.

SUMARIO

[0006] En una modalidad, un dispositivo de celda de prueba para inmunoensayo de trayectoria dual, para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, se dota de un primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal o lateral, y un segundo material absorbente que define una segunda trayectoria de flujo horizontal o lateral, y el primer y segundo materiales absorbentes se superponen entre sí en un sitio de prueba. La primera trayectoria de flujo tiene una primera ubicación para recibir una primera solución la cual, en el caso de un sistema de conjugado líquido, es una solución de conjugado, y la cual, en el caso de un sistema de conjugado seco, es una solución reguladora. En casos donde se utiliza una solución reguladora, el primer material absorbente se dota de un primer conjugado (móvil) ubicado corriente abajo de la primera ubicación. La segunda trayectoria de flujo tiene una segunda ubicación para recibir una segunda solución que comprende una muestra. En una modalidad, la muestra es una muestra de sangre, orina, saliva u otra, que puede mezclarse con solución reguladora si se desea, y las moléculas de unión a segundo ligando inmovilizado se ubican corriente abajo de la segunda ubicación. Las moléculas de unión a segundo ligando se relacionan con el primer ligando para el cual la muestra se está probando, pero no son las mismas. El segundo material absorbente es distinto o se separa del primer material absorbente. El sitio de prueba se dota de moléculas de unión a primer ligando,

tales como antígenos o anticuerpos inmovilizados, u otras moléculas tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas en donde el primer y segundo materiales absorbentes se superponen entre sí. Las moléculas de unión a primer ligando en el sitio de prueba pueden disponerse en una o más líneas u otros patrones distintivos. Una línea o sitio de control puede proporcionarse corriente abajo del sitio de prueba.

[0007] En una modalidad, las moléculas de unión a segundo ligando son segundos conjugados que incluyen moléculas de unión a ligando inmovilizado conjugadas con partículas. En una modalidad, el segundo conjugado incluye antígenos conjugados con partículas. En una modalidad, las partículas conjugadas con los antígenos comprenden látex blanco. En otra modalidad, el segundo conjugado incluye anticuerpos conjugados con partículas. En una modalidad, las partículas conjugadas con los anticuerpos comprenden látex blanco. En una modalidad dirigida a la detección de influenza (“gripe”), las moléculas de unión a segundo ligando incluyen antígenos de por lo menos un antígeno de influenza (“gripe”) y el sitio de prueba se dota de antígeno inmovilizado de por lo menos un antígeno de influenza diferente pero relacionado con el o los antígenos de influenza del conjugado inmovilizado. En una modalidad, el primer conjugado es una solución de oro conjugada a proteína A.

[0008] En otra modalidad, un dispositivo de celda de prueba para inmunoensayo de trayectoria dual, para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, se dota de un primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal, y un segundo material absorbente distinto al primer material absorbente y que define una segunda trayectoria de flujo horizontal, y el primer y segundo materiales absorbentes se superponen entre sí en un sitio de prueba. La primera trayectoria de flujo tiene una primera ubicación para recibir una primera solución la cual, en el caso de un sistema de conjugado líquido, es una solución de conjugado, y la cual, en el caso de un sistema de conjugado seco, es una solución reguladora. En casos donde se utiliza una

solución reguladora, el primer material absorbente se dota de un primer conjugado (móvil) ubicado corriente abajo de la primera ubicación. La segunda trayectoria de flujo tiene una segunda ubicación para recibir una segunda solución que comprende una muestra tal como sangre, orina, saliva u otra muestra que se ha mezclado previamente con moléculas de unión a segundo ligando y, si se desea, regulador, y se ha filtrado opcionalmente antes de aplicarse como la segunda solución a la segunda ubicación. En casos donde la muestra se ha mezclado con moléculas de unión a segundo ligando y no se ha filtrado, en una modalidad, la segunda trayectoria de flujo puede incluir un filtro para la segunda solución. Las moléculas de unión a segundo ligando se relacionan con el primer ligando para el cual la muestra se está probando, pero no son las mismas y, en una modalidad pueden incluir moléculas de unión a ligando inmovilizado, tales como antígenos o anticuerpos conjugados con partículas tales como el látex. En una modalidad dirigida a la detección de influenza ("gripe"), las moléculas de unión a segundo ligando incluyen antígenos de por lo menos un antígeno de influenza ("gripe") y el sitio de prueba se dota de antígeno inmovilizado de por lo menos un antígeno de influenza diferente pero relacionado con el o los antígenos de influenza del conjugado inmovilizado. En una modalidad, el sitio de prueba se dota de moléculas de unión a primer ligando, tales como antígenos o anticuerpos inmovilizados, u otras moléculas tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas en donde el primer y segundo materiales absorbentes se superponen entre sí. Las moléculas de unión a primer ligando en el sitio de prueba pueden disponerse en una o más líneas u otros patrones distintivos. Una línea o sitio de control puede proporcionarse corriente abajo del sitio de prueba.

[0009] En un aspecto, las moléculas de unión a segundo ligando se utilizan como mecanismo de extracción total que captura y, en consecuencia, extrae totalmente los anticuerpos (o antígenos) en relación con los anticuerpos (o antígenos) que se están detectando en el sitio de prueba. A modo de ejemplo, en casos donde el sitio de prueba

incluye un antígeno de influenza A pandémica para identificar la presencia de un anticuerpo contra influenza A en la muestra, el segundo conjugado puede proporcionarse con uno o más antígenos de influenza A y/o antígenos de influenza B comunes. De esta manera, los anticuerpos contra influenza A e influenza B comunes en la muestra, que de otro modo pueden capturarse o retenerse en el sitio de prueba (a causa de su estructura, la cual puede ser similar en muchas formas a la de los anticuerpos contra influenza A pandémica relacionados), por lo general se capturan por el segundo conjugado inmovilizado, es decir, se extrae totalmente el número de anticuerpos contra influenza A e influenza B comunes que alcanzan el sitio de prueba. Como resultado, la sensibilidad de la prueba se incrementa.

[0010] En un aspecto, el uso de un conjugado de látex blanco, como el conjugado de extracción total inmovilizado, reduce la visibilidad del conjugado si se suelta y viaja con la muestra hacia el sitio de prueba y llega al sitio de prueba.

[0011] En casos donde la celda de prueba se proporciona en un alojamiento, el alojamiento se dota de una primera abertura adyacente a la primera ubicación, y una segunda abertura adyacente a la segunda ubicación. Una ventana de visualización se proporciona en el alojamiento por arriba de la línea de prueba. De igual forma, una ventana de visualización puede proporcionarse en el alojamiento por arriba de la línea de control.

[0012] De acuerdo con un conjunto de modalidades, los materiales absorbentes se disponen en una conformación en T, donde la primera ubicación para recibir el regulador o solución de regulador-conjugado se ubica cerca de un extremo de la barra superior de la T, la segunda ubicación para recibir la muestra se ubica cerca del extremo del tronco de la T, y los materiales absorbentes se superponen entre sí en la intersección. Por supuesto, los materiales absorbentes pueden disponerse en otras configuraciones, y el alojamiento puede adoptar otras conformaciones, tales como rectangular, cuadrada, irregular, etc. sin

importar la manera en la cual se disponen los materiales absorbentes.

[0013] En una modalidad de la invención, los materiales, grosores y longitudes del primer y segundo materiales absorbentes se eligen para ajustar la sincronización en relación con la muestra líquida y regulador líquido al alcanzar el sitio de prueba.

5 **[0014]** En el sistema de conjugado seco, un primer conjugado seco se proporciona entre la primera abertura y el sitio de prueba. El primer conjugado se soporta en o dentro del material absorbente de tal modo que, cuando un regulador se agrega en la primera abertura, el material absorbente absorba por capilaridad el regulador hacia el primer conjugado, el cual entonces se lleva por el regulador hacia el sitio de prueba. En el
10 sistema de conjugado líquido, un subsistema líquido de regulador-conjugado se proporciona y aplica a la primera abertura. El material absorbente entonces absorbe por capilaridad el subsistema de regulador-conjugado hacia el sitio de prueba.

[0015] En otra modalidad, un dispositivo de celda de prueba para inmunoensayo de trayectoria dual, para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, se
15 dota de un primer material absorbente que define una primera trayectoria de flujo horizontal, y un segundo material absorbente distinto al primer material absorbente y que define una segunda trayectoria de flujo horizontal, y el primer y segundo materiales absorbentes se superponen entre sí en un sitio de prueba. La primera trayectoria de flujo tiene una primera ubicación para recibir una primera solución la cual, en el caso de un
20 sistema de conjugado líquido, es una solución de conjugado, y la cual, en el caso de un sistema de conjugado seco, es una solución reguladora. En casos donde se utiliza una solución reguladora, el primer material absorbente se dota de un primer conjugado (móvil) ubicado corriente abajo de la primera ubicación. El primer conjugado incluye un marcador, tal como un látex o partícula de color, y un primer agente de unión temporal tal como (a
25 modo de ejemplo solamente) estreptoavidina o un anticuerpo anti-biotina. La segunda trayectoria de flujo tiene una segunda ubicación para recibir una segunda solución que

comprende una muestra tal como sangre, orina, saliva u otra muestra que se ha mezclado opcionalmente antes con moléculas de unión a segundo ligando y, si se desea, regulador, y se filtra opcionalmente para remover las moléculas de unión a segundo ligando y el segundo ligando unido a la misma, antes de aplicarse como segunda solución a la segunda ubicación. La segunda trayectoria de flujo se dota de moléculas de unión a primer ligando inmovilizado. Las moléculas de unión a primer ligando inmovilizado pueden incluir un segundo conjugado de partículas de látex (por ejemplo, látex blanco) a lo cual se unen anticuerpos o antígenos, y un segundo agente de unión temporal, tal como biotina. En esta forma, cuando la muestra incluye el primer ligando, las moléculas de unión a primer ligando con el primer ligando y segundo agente de unión temporal asociado al mismo, se llevan por la solución de muestra filtrada hacia el sitio de prueba a lo largo de la segunda trayectoria de flujo. El sitio de prueba, el cual se ubica donde el primer y segundo materiales absorbentes se superponen entre sí, se dota de un agente de unión inmovilizado que se une al antígeno o anticuerpos de la muestra. De esta manera, el ligando con el segundo agente de unión temporal se une en el sitio de prueba y, cuando el primer conjugado desciende a la primera trayectoria de flujo con el látex o partícula de color y primer agente de unión temporal, el agente de unión temporal se asociará y mantendrá el látex de color en el sitio de prueba. Una línea o sitio de control puede proporcionarse corriente abajo del sitio de prueba.

[0016] En un aspecto, en casos donde la primera trayectoria de flujo se dota de un conjugado que tiene una segunda trayectoria de flujo, se dota de moléculas de unión a primer ligando inmovilizado con un segundo agente de unión temporal, y la primera línea de prueba se dota de un conjugado que tiene un primer agente de unión temporal, y la sensibilidad de la prueba se potencia.

[0017] De acuerdo con un método, se proporciona un sistema para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, e incluye una celda de prueba que tiene

un primer material absorbente que tiene una primera ubicación para recibir una solución reguladora (en el caso de un sistema de conjugado seco) o una solución de conjugado (en el caso de un sistema de conjugado líquido) con el primer material absorbente definiendo una primera trayectoria de flujo horizontal, y un segundo material absorbente que tiene una segunda ubicación para recibir una muestra y que define una segunda trayectoria de flujo horizontal distinta a la primera trayectoria de flujo, con el segundo material absorbente con moléculas de unión a segundo ligando ubicadas corriente abajo de la segunda ubicación, y una línea de prueba o sitio de prueba con moléculas de unión a primer ligando inmovilizado, tales como antígenos, anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas en una zona de prueba en un empalme del primer y segundo materiales absorbentes. Si se desea, también se proporciona un alojamiento que tiene una primera abertura para recibir la solución reguladora o de conjugado, una segunda abertura para recibir la muestra, y una ventana de visualización por arriba de la línea de prueba. Una muestra de interés se proporciona a la segunda abertura o ubicación y se le permite migrar hacia abajo a la línea de prueba con el paso del tiempo. Después de un período deseado, un líquido, tal como una solución reguladora, se agrega a la primera abertura o ubicación. Si el primer material absorbente está soportando un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado seco), el líquido puede ser simplemente una solución reguladora. Si el primer material absorbente no está soportando un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado líquido), el líquido puede ser un subsistema líquido de regulador-conjugado. En cualquier caso, después de un tiempo suficiente para permitir que el primer conjugado migre al sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona), el sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona) se inspecciona con el fin de determinar si la muestra es “positiva” o no.

[0018] De acuerdo con otro método, se proporciona un sistema para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, e incluye una celda de prueba que tiene

un primer material absorbente que tiene una primera ubicación para recibir una solución reguladora (en el caso de un sistema de conjugado seco) o una solución de conjugado (en el caso de un sistema de conjugado líquido) con el primer material absorbente definiendo una primera trayectoria de flujo horizontal, y un segundo material absorbente que tiene una segunda ubicación para recibir una muestra y que define una segunda trayectoria de flujo horizontal distinta a la primera trayectoria de flujo con un filtro opcional, y una línea de prueba o sitio de prueba con moléculas de unión a primer ligando inmovilizado, tales como antígenos, anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos, etc. ubicadas en una zona de prueba en un empalme del primer y segundo materiales absorbentes. Si se desea, también se proporciona un alojamiento que tiene una primera abertura para recibir la solución reguladora o de conjugado, una segunda abertura para recibir la muestra, y una ventana de visualización por arriba de la línea de prueba. Una muestra de interés se proporciona a una cámara de mezclado que tiene moléculas de unión a segundo ligando y regulador opcional. La muestra se mezcla con las moléculas de unión a segundo ligando (y regulador) y, opcionalmente, se filtra para remover las moléculas de unión a segundo ligando y segundo ligando asociado a las mismas, si la segunda trayectoria de flujo no tiene filtro. La muestra opcionalmente filtrada se proporciona a la segunda abertura o ubicación y se le permite migrar a lo largo de la segunda trayectoria de flujo hacia abajo al sitio de prueba. Después de un período deseado, un líquido, tal como una solución reguladora, se agrega a la primera abertura o ubicación. Si el primer material absorbente está soportando un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado seco), el líquido puede ser simplemente una solución reguladora. Si el primer material absorbente no está soportando un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado líquido), el líquido puede ser un subsistema líquido de regulador-conjugado. En cualquier caso, después de un tiempo suficiente para permitir que el primer conjugado migre al sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona), el sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona) se

inspecciona con el fin de determinar si la muestra es “positiva” o no.

[0019] De acuerdo con otro método, se proporciona un sistema para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, e incluye una celda de prueba que tiene un primer material absorbente que tiene una primera ubicación para recibir una solución reguladora (en el caso de un sistema de conjugado seco) o una solución de conjugado (en el caso de un sistema de conjugado líquido) con el primer material absorbente definiendo una primera trayectoria de flujo horizontal para un primer conjugado que tiene un marcador y un primer agente de unión temporal, y un segundo material absorbente que tiene una segunda ubicación para recibir una muestra y que define una segunda trayectoria de flujo horizontal distinta a la primera trayectoria de flujo con moléculas de unión a primer ligando inmovilizado, tales como un anticuerpo o antígeno unido a un segundo agente de unión temporal, y una línea de prueba o sitio de prueba con agente de unión inmovilizado ubicado en una zona de prueba en un empalme del primer y segundo materiales absorbentes. Si se desea, también se proporciona un alojamiento que tiene una primera abertura para recibir la solución reguladora o de conjugado, una segunda abertura para recibir la muestra, y una ventana de visualización por arriba de la línea de prueba. Una muestra de interés se proporciona opcionalmente a una cámara de mezclado que tiene moléculas de unión a segundo ligando y regulador opcional. La muestra puede mezclarse con las moléculas de unión a segundo ligando (y regulador), y filtrarse para remover las moléculas de unión a segundo ligando y segundo ligando asociado a las mismas. La muestra opcionalmente filtrada se proporciona a la segunda abertura o ubicación, y entonces puede interactuar con un segundo conjugado que tiene un segundo agente de unión temporal a medida que migra a lo largo de la segunda trayectoria de flujo hacia el sitio de prueba. Después de un período deseado, un líquido, tal como una solución reguladora, se agrega a la primera abertura o ubicación. Si el primer material absorbente está soportando un primer conjugado (es decir, en un sistema de conjugado seco), el

líquido puede ser simplemente una solución reguladora. Si el primer material absorbente no está soportando un conjugado (es decir, en un sistema de conjugado líquido), el líquido puede ser un subsistema líquido de regulador-conjugado que contiene el primer conjugado. En cualquier caso, después de un tiempo suficiente para permitir que el
5 segundo conjugado migre al sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona), el sitio de prueba (y sitio de control si se proporciona) se inspecciona con el fin de determinar si la muestra es “positiva” o no.

[0020] Se apreciará que los sistemas pueden utilizarse en conjunto con diferentes tipos de muestras, tales como sangre, orina, saliva, etc. La muestra puede diluirse o
10 mezclarse con regulador antes de agregarse a través del segundo orificio. Alternativamente, en algunos casos, la muestra puede agregarse a través del orificio y luego puede agregarse un diluyente a través del mismo orificio.

[0021] Los objetivos y ventajas se harán obvios para los expertos en la técnica con la referencia a la descripción detallada, tomada en conjunto con las figuras
15 proporcionadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0022] La **Figura 1** es una vista esquemática superior de una primera modalidad.

[0023] La **Figura 1A** es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 1A-1A de la Figura 1.

20 [0024] La **Figura 1B** es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 1B-1B de la Figura 1.

[0025] La **Figura 2A** es una gráfica que compara los resultados de prueba del aparato de la Figura 1 contra los resultados de prueba de un aparato de plataforma de trayectoria dual estándar, y que muestra la extracción total de anticuerpos para influenza
25 no pandémica por el aparato de la Figura 1.

[0026] La **Figura 2B** es una gráfica que compara los resultados de prueba del

aparato de la Figura 1 contra los resultados de prueba de un aparato de plataforma de trayectoria dual estándar, y que muestra la falta de extracción total de anticuerpos para influenza B por el aparato de la Figura 1.

[0027] La **Figura 3** es un diagrama que muestra un equipo que incluye un vial de agua, un vial con conjugado, un vial con diluyente, un dispositivo para recolección y transferencia de sangre, tres pipetas de transferencia y una cámara de filtración.

[0028] La **Figura 4A** es un diagrama que representa una primera modalidad alternativa.

[0029] La **Figura 4B** es un diagrama que representa una segunda modalidad alternativa.

[0030] La **Figura 4C** es un diagrama que representa una tercera modalidad alternativa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0031] Regresando ahora a las Figuras 1, 1A y 1B, una celda de prueba para dispositivo de inmunoensayo 10, para detectar la presencia de un primer ligando en una muestra, se proporciona e incluye un alojamiento 20 que tiene una pared superior 21 que define un primer y segundo orificios 24, 26, y una ventana 28, y un primer y segundo materiales absorbentes o porosos 30, 32 que definen trayectorias de flujo horizontal o lateral perpendiculares en el alojamiento. El primer material absorbente 30 incluye una pluralidad de zonas y puede elaborarse a partir de una pluralidad de materiales. Una primera zona 31 (algunas veces denominada zona de filtración) se ubica en el primer orificio 24 y se extiende a una segunda zona 33 (algunas veces denominada zona de prueba) la cual se ubica en el empalme de una "T". La primera zona 31 de preferencia incluye un filtro 31a, una almohadilla 31b sobre o en la cual un conjugado 39, que tiene antígenos o anticuerpos deseados con marcadores de color asociados, se deposita e inmoviliza, y una primera porción de una membrana delgada o material absorbente o

poroso 30 típicamente elaborado a partir de nitrocelulosa con un refuerzo de plástico (no mostrado). En una modalidad, y a modo de ejemplo solamente, el conjugado 39 puede ser una solución de oro conjugada a proteína A. La primera zona 31 se adapta para recibir una solución reguladora, para dar lugar a que la solución reguladora contacte el conjugado, lo que en consecuencia moviliza el conjugado, y para absorber por capilaridad la solución reguladora que lleva conjugado hacia la segunda zona 33. La segunda zona (prueba) 33 incluye una segunda porción de la membrana delgada 30, la cual puede imprimirse con una línea de prueba 50 que tiene moléculas de unión a primer ligando inmovilizado, tales como antígenos o anticuerpos (lo que depende de si la celda de prueba se diseña para detectar la presencia de anticuerpos o antígenos), en la membrana, como se conoce ampliamente en la técnica. La línea de prueba 50 puede verse a través de la ventana 28 de plástico transparente proporcionada en el alojamiento. Una tercera zona 35 (algunas veces denominada zona de control), la cual incluye una tercera porción de la membrana delgada 30, también puede imprimirse con una línea de control 60 que típicamente contiene anticuerpos para los antígenos conjugados (o, en algunos casos, anticuerpos que se unirán a anticuerpos conjugados, o incluso antígenos que se unirán a anticuerpos conjugados), como se conoce ampliamente en la técnica. En casos donde se proporciona la tercera zona 35, la ventana 28 se extiende por arriba de la línea de control 60. Si se desea, una cuarta zona 37 (algunas veces denominada zona de depósito) puede proporcionarse como depósito de absorbente capilar, como también se conoce ampliamente en la técnica. La cuarta zona 37 incluye un papel absorbente relativamente más grueso. De preferencia, superponiéndose en todas las zonas, se encuentra una película o tarjeta delgada de plástico de preferencia transparente 38a, que tiene un adhesivo que mantiene los materiales absorbentes en su lugar. La tarjeta 38a puede cortarse con una abertura en el orificio 24, a fin de que no bloquee el acceso de líquido hacia el orificio 24.

[0032] El segundo material absorbente 32 también puede elaborarse a partir de una pluralidad de materiales e incluir una pluralidad de zonas. La primera zona 62 (algunas veces denominada zona de filtración) incluye un filtro o almohadilla 32a y una almohadilla 32b, sobre o en la cual las moléculas de unión a segundo ligando se proporcionan e inmovilizan, donde el segundo ligando es diferente pero está relacionado con el primer ligando, y una primera porción de una membrana delgada o material absorbente o poroso 32, típicamente elaborado a partir de nitrocelulosa con un refuerzo (no mostrado). Las moléculas de unión a segundo ligando pueden incluir antígenos o anticuerpos u otras moléculas tales como aptámeros, ácidos nucleicos, etc. que se unen a ligandos que son similares pero diferentes a los primeros ligandos. Las moléculas de unión a segundo ligando pueden proporcionarse como conjugado 41 que tiene antígenos o anticuerpos deseados con partículas asociadas. La primera zona 62 se ubica en el segundo orificio 26 y se extiende a la segunda zona 63. La segunda zona 63 incluye una segunda porción de la membrana delgada 32, la cual se encuentra en contacto con la segunda zona 33 del primer material absorbente 30. Como se observa en las Figuras 1A y 1B, el primer material absorbente 30 se superpone al segundo material absorbente 32, de tal modo que las membranas se encuentren en contacto entre sí (al contrario de los refuerzos que contactan las membranas o entre sí), y de tal modo que la línea de prueba 50 se ubique con efectividad entre las membranas. De esta manera, la línea de prueba 50 puede imprimirse en la segunda zona 63 del segundo material absorbente 32, en lugar o además de la segunda zona 33 del primer material absorbente 30. Si se desea, puede utilizarse una película o tarjeta delgada de plástico 38b que tiene un adhesivo que mantiene el segundo material absorbente en su lugar. Con la disposición proporcionada, toma tiempo para que la muestra viaje de su punto de aplicación a la segunda zona 63 y el sitio de prueba, y la aplicación de la muestra a la segunda trayectoria de flujo no moja inmediatamente el sitio de prueba.

[0033] En una modalidad, el conjugado 41 en la almohadilla de conjugado 32b incluye antígenos conjugados con una partícula que no es fácilmente visible para el ojo humano contra el fondo del área de prueba. En una modalidad, la partícula es un látex blanco. Una modalidad de un látex blanco es una perla de látex blanco de 0.32 micras disponible de Thermo Fisher Scientific, Inc., Holtsville, NY. Los antígenos del conjugado 41 son diferentes pero están relacionados con los antígenos de la línea de prueba 50. A modo de ejemplo solamente, en una modalidad dirigida a la detección de influenza ("gripe") pandémica, el segundo conjugado incluye antígenos de por lo menos un antígeno de influenza ("gripe") (por ejemplo, dos antígenos de influenza A diferentes, tales como antígenos de influenza H1 y H3) y el sitio de prueba se dota de antígeno inmovilizado de por lo menos el antígeno de influenza pandémica de interés, el cual es diferente pero está relacionado con el o los antígenos de influenza del conjugado inmovilizado 41. En otra modalidad, el segundo conjugado incluye anticuerpos conjugados con látex blanco y el sitio de prueba 50 incluye anticuerpos diferentes pero relacionados con los anticuerpos del conjugado 41.

[0034] En un aspecto, el segundo conjugado se utiliza como mecanismo de extracción total que captura y, en consecuencia, extrae totalmente los anticuerpos en relación con los anticuerpos que se están detectando en el sitio de prueba. A modo de ejemplo, en casos donde el sitio de prueba incluye un antígeno de influenza B para identificar la presencia de un anticuerpo contra influenza B en la muestra, el segundo conjugado puede proporcionarse con uno o más antígenos de influenza A, es decir, puede haber una pluralidad de segundos conjugados ligeramente diferentes. De esta manera, los anticuerpos contra influenza A en la muestra, que de otro modo pueden capturarse o retenerse en el sitio de prueba (a causa de su estructura, la cual puede ser similar en muchas formas a la de los anticuerpos contra influenza B relacionados), por lo general se capturan por el segundo conjugado inmovilizado, es decir, se extrae totalmente el número

de anticuerpos contra influenza A que alcanzan el sitio de prueba. Como resultado, la sensibilidad de la prueba se incrementa. Se apreciará que el sitio de prueba puede incluir un antígeno de influenza A para identificar la presencia de un anticuerpo contra influenza A particular en la muestra, y el segundo conjugado puede proporcionarse con uno o más antígenos de influenza B y uno o más antígenos de influenza A que son diferentes pero están relacionados con el antígeno de influenza A particular en el sitio de prueba. Además, se apreciará que el sitio de prueba puede proporcionarse con más de una línea de prueba, que contiene diferentes antígenos de influenza. Esos antígenos de influenza pueden incluir una pluralidad de antígenos de influenza A, una pluralidad de antígenos de influenza B, o uno o más antígenos de influenza A y uno o más de influenza B. El segundo conjugado inmovilizado se ajustará por consiguiente para incluir un conjugado que extraerá totalmente aquellos antígenos que se relacionan con los antígenos de las líneas de prueba, pero no son el objeto de la prueba.

[0035] En un aspecto, el uso de un conjugado de látex blanco, como el conjugado de extracción total inmovilizado, reduce la visibilidad del conjugado si se suelta y viaja con la muestra hacia el sitio de prueba y llega a capturarse en el sitio de prueba. En otro aspecto, perlas de látex, de un tamaño mayor al del tamaño de poro de la segunda trayectoria de migración, pueden utilizarse con el fin de impedir el movimiento del conjugado a lo largo de la segunda trayectoria de migración.

[0036] En casos donde tiras de nitrocelulosa de tipo estándar con un refuerzo se utilizan como la primera y segunda membranas, las membranas pueden tener diferentes tamaños de poros. Por ejemplo, si la membrana 31 (para la primera migración de conjugado) tiene un tamaño de poro de 3 μm , y la membrana 32 (para la migración de muestra) tiene un tamaño de poro de 15 μm , la muestra aplicada a la membrana 32 tenderá a migrar y permanecer en la membrana de muestra 32 y tenderá a no migrar hacia la membrana de conjugado 31.

[0037] El inmunoensayo de las Figuras 1, 1A y 1B de preferencia se utiliza de la siguiente manera. Primero, una muestra (no mostrada) que posiblemente contiene anticuerpos (o antígenos) se diluye opcionalmente (por ejemplo, con regulador) y se proporciona a la segunda abertura u orificio 26. La muestra no moja inmediatamente el sitio de prueba, sino se deja que tome tiempo para migrar de la almohadilla 32a a la almohadilla de conjugado 32b y luego de la zona 61 del segundo material absorbente 32 a su segunda zona 63, la cual está en contacto con la segunda zona 33 del primer material absorbente 30. Si la muestra no se diluye primero, opcionalmente, después de proporcionar la muestra al orificio 26, una cantidad medida de líquido, tal como una solución reguladora, puede agregarse al orificio 26 para ayudar a la migración de la muestra. No obstante, si la muestra incluye antígenos o anticuerpos que reaccionan con el segundo conjugado 41 de la almohadilla de conjugado 32b, esos antígenos o anticuerpos se capturan por el conjugado 41 y se extraen totalmente de la muestra antes de alcanzar la línea de prueba 50, que se imprime en la parte superior de la segunda zona 33 del primer material absorbente o se infunde en el mismo. En la medida en que el conjugado 41 se suelte de la almohadilla 32b y viaje a lo largo de la membrana 32 hacia abajo al sitio de prueba y se capture ahí, el conjugado 41 no será particularmente visible, dado que las partículas de látex blanco no se verán sobre el fondo blanco del sitio de prueba. No obstante, después de un período deseado, momento en el cual los anticuerpos (o antígenos) en la muestra (si se presentan) habrán tenido la oportunidad de unirse a los antígenos (o anticuerpos) inmovilizados en la línea de prueba 50, un líquido, tal como una solución reguladora (no mostrada) se agrega a la primera abertura 24. Después de otro período, suficiente para permitir que la solución reguladora dé lugar a que el conjugado migre al sitio de prueba 50 (y sitio de control 60 si se proporciona), y se una con los antígenos (o anticuerpos) de la muestra que se capturan en el sitio de prueba 50 (en su caso), el sitio de prueba (y sitio de control 60 si se proporciona) se inspecciona mediante

la ventana 28 con el fin de determinar si la muestra es “positiva” o no. Típicamente, una prueba “positiva”, que indica la presencia del anticuerpo (o antígeno) en la muestra, se obtiene cuando tanto el sitio de prueba 50 como el sitio de control 60 muestran líneas de color. Una prueba “negativa”, que indica la falta de la presencia del anticuerpo (o antígeno) en la muestra, se obtiene cuando sólo el sitio de control 60 muestra una línea de color.

[0038] El uso del aparato puede agilizarse al dotar al alojamiento de una numeración y/o leyenda para indicar que el orificio 26 es para recibir la muestra (y, opcionalmente, algún regulador) y debe utilizarse primero, y que el orificio 24 es para recibir la solución reguladora y debe utilizarse en segundo lugar.

[0039] Los expertos en la técnica apreciarán que el inmunoensayo 10 funciona de la siguiente manera. Dado que la línea de prueba 50 se dota de antígenos (o anticuerpos) inmovilizados en una membrana, si la muestra de prueba contiene anticuerpos para los antígenos (o antígenos para los anticuerpos), los anticuerpos (o antígenos) se unirán por sí mismos a los antígenos (o anticuerpos) en la línea de prueba. Dado que la muestra de prueba pasa a través de una almohadilla de conjugado 32b que tiene el segundo conjugado inmovilizado 41 con antígenos (o anticuerpos) que están relacionados pero son diferentes a los antígenos (o anticuerpos) de la línea de prueba, los anticuerpos o antígenos relacionados con los que se prueban, si se presentan, se capturarán por el conjugado 41 y se mantendrán en la almohadilla de conjugado 32b, y cuando la muestra de prueba alcance la línea de prueba, los anticuerpos (o antígenos) de la muestra, si se presentan, se unirán al antígeno (o anticuerpo) en la línea de prueba. Dado que los anticuerpos (o antígenos) relacionados se extraen totalmente, no alcanzarán la línea de prueba y, si lo hacen, ya estarán conjugados con un látex que reducirá su actividad en el sitio de prueba. No obstante, el sitio de prueba será más específico para los anticuerpos o antígenos cuya presencia debe detectarse. Después de que la muestra ha alcanzado el sitio de prueba, se da lugar a que el primer conjugado 39, que contiene un antígeno para

el anticuerpo (o anticuerpo para el antígeno) acoplado a un marcador de color, migre a la línea de prueba. Si la muestra de prueba contiene los anticuerpos (o antígenos) que ahora se mantienen en la línea de prueba 50, el antígeno (o anticuerpo) del conjugado se unirá por sí mismo a los anticuerpos (o antígenos) y el marcador de color dará lugar a que aparezca una línea de color en el sitio de prueba 50. Si la muestra de prueba no contiene anticuerpos (o antígenos), el conjugado no tendrá los anticuerpos (antígenos) para unirse en la línea de prueba 50, y no aparecerá una línea de color en el sitio de prueba 50. Por otro lado, dado que la línea de control 60 se dota de anticuerpos (o antígenos), los antígenos (o anticuerpos) del conjugado siempre se unirán a los anticuerpos (o antígenos) en la línea de control 60, lo que en consecuencia dará lugar a que una línea de color aparezca en el sitio de control 60 si el conjugado alcanza el sitio de control 60. De esta manera, si se proporciona suficiente solución reguladora a la celda de prueba, una línea de color siempre debe aparecer en el sitio de control 60, lo que en consecuencia proporciona un control para la prueba.

[0040] Al regresar a la Figura 2A, puede verse que el aparato de las Figuras 1, 1A y 1B puede proporcionar resultados de prueba mejorados en relación con un aparato de plataforma de trayectoria dual estándar, tal como se describe y muestra en la Patente de EUA # 7,189,522 previamente incorporada. En particular, tres conjuntos de cinco aparatos de prueba, tal como se describe arriba con referencia a las Figuras 1, 1A y 1B, se prepararon con una segunda almohadilla de conjugado 32b proporcionada con un conjugado 41 que tenía antígeno de influenza A H3 y H1 conjugado con perlas, y una línea de prueba OPP proporcionada con antígenos de influenza A. Un conjunto de cinco aparatos utilizó perlas magnéticas conjugadas por separado con antígeno H1 y antígeno H3 (H1 + H3 Mag.). Un segundo conjunto utilizó perlas de látex conjugadas por separado con antígeno H1 y H3 (H1 + H3 Látex). Un tercer conjunto utilizó perlas de látex con conjugación combinada de H1 y H3 (H1/H3 Látex). De igual forma, un conjunto de

dispositivos, tal como se describe y muestra en la Patente de EUA # 7,189,522 previamente incorporada, se proporcionaron (Sin Ad) con una línea de prueba que tenía los mismos antígenos de influenza A. Muestras de prueba de cinco individuos diferentes, que tenían anticuerpos contra H3, se prepararon y aplicaron a las segundas trayectorias de flujo de los conjuntos de dispositivos descritos arriba, con referencia a las Figuras 1, 1A y 1B y el conjunto de dispositivos de la Patente de EUA # 7,189,522. Después de esperar a que las muestras alcanzaran los sitios de prueba, se agregó regulador a la primera trayectoria de migración de cada dispositivo para mover el conjugado de marcadores a los sitios de prueba. La intensidad de las señales en cada sitio de prueba se midió y graficó. Como se observa en la Figura 2A, las líneas de prueba de los cinco aparatos de plataforma de trayectoria dual estándar (Sin Ad) mostraron una intensidad relativa (con un lector digital) que varió de aproximadamente 700 a mucho más de 4000, en comparación con una intensidad relativa de casi cero para el aparato de las Figuras 1, 1A y 1B al utilizar las perlas para las perlas magnéticas y de látex. Estas pruebas muestran que el aparato de la Figura 1 tiene éxito en extraer totalmente los anticuerpos contra influenza A al utilizar el conjugado antígeno de influenza A - partícula en la trayectoria de flujo de la muestra. En casos donde se utilizan partículas blancas, en la medida en que algún conjugado antígeno de influenza A - partícula se lleve hacia el sitio de prueba y se capture ahí, la partícula blanda impide que el conjugado se vea contra el fondo blanco de la tarjeta 38b sobre la cual se ubica la línea de prueba 50. Se apreciará que, al extraer totalmente H1 y H3 de influenza A (influenza estacional) con el sistema de conjugado de látex en la trayectoria de la muestra, la sensibilidad y especificidad de la prueba con una línea de prueba para influenza A pandémica se incrementarán a causa de la eliminación de la reactividad cruzada entre los antígenos de influenza A estacional y pandémica.

[0041] En una modalidad, el conjugado en la trayectoria de flujo de muestra utiliza fragmentos o fracciones de H1 y H3 de influenza estacional conjugados a partículas de

látex. Los fragmentos son porciones inmunodominantes de la partícula que no reaccionarán en forma cruzada sustancialmente con otros antígenos de influenza, y son diferentes a los anticuerpos contra H1 y H3 que pueden utilizarse como anticuerpos de captura en el sitio de prueba en la membrana (la molécula completa de H1 y H3). Como resultado, cuando una prueba para influenza pandémica se dota de una línea de prueba que incluye anticuerpos contra influenza pandémica, los conjugados de fragmentos H1 y H3 tendrán una mínima reactividad cruzada con los antígenos de influenza pandémica, lo que resulta en una mejor detección de una influenza pandémica en la línea de prueba.

[0042] Al regresar a la Figura 2B, se prepararon otras muestras que tenían anticuerpos contra influenza B/Bris. Las muestras se aplicaron a un conjunto de aparatos de plataforma de trayectoria dual estándar, tal como se describe en la Patente de EUA # 7,189,522 previamente incorporada, donde la línea de prueba tenía antígeno de influenza B/Bris (Sin Ad) y a conjuntos de dispositivos tal como se muestran en las Figuras 1, 1A y 1B, donde la segunda almohadilla de conjugado 32b se dotó de un conjugado 41 que tenía antígenos de influenza A H1 y H3 conjugados a perlas, y una línea de prueba dotada de antígenos de influenza B/Bris. Como con las pruebas de la Figura 2A, un conjunto de aparatos utilizó perlas magnéticas conjugadas por separado a H1 y H3 (H1 + H3 Mag.), un segundo conjunto utilizó perlas de látex blanco de 0.32 micras conjugadas por separado (H1 + H3 Látex), en tanto que un tercer conjunto utilizó las perlas de látex blanco con conjugación combinada (H1/H3 Látex). Como se observa en la Figura 2B, los resultados positivos en la línea de prueba del aparato 10 de la Figura 1 son justamente tan fuertes como las líneas de prueba del aparato de plataforma de trayectoria dual estándar que muestra que el conjugado 41, ubicado en la segunda trayectoria de migración, no interfiere con los resultados, dado que las señales en las líneas de prueba fueron casi las mismas para todas las pruebas de una muestra particular. Al tomar las Figuras 2A y 2B en conjunto, se apreciará que el aparato 10 de las Figuras 1, 1A y 1B tiene una sensibilidad

superior.

[0043] Al regresar ahora a la Figura 3, se observa un equipo 100 que incluye un vial de agua 101 con agua 102, un vial 103 con conjugado de látex secado por congelación 104, un vial de diluyente 105 con un diluyente 106, un dispositivo para recolección y transferencia de sangre 107, cuatro pipetas de transferencia 108a, 108b, 108c, 108d, y un ensamble de cámara de filtración 109. Se apreciará que el equipo puede tener diferentes números de elementos. De esta manera, en vez de mantener por separado el agua y conjugado de látex secado por congelación, un conjugado de látex “mojado” puede almacenarse al utilizar agua y/o diluyente. Asimismo, en vez de mantener un vial de diluyente, el diluyente puede proporcionarse como parte del conjugado de látex “mojado”. También, en vez de utilizar cuatro pipetas de transferencia, pueden utilizarse menos elementos de transferencia. En una modalidad, el equipo 100 puede utilizarse en conjunto con una celda de prueba para dispositivo de inmunoensayo, tal como el dispositivo 10 de las Figuras 1, 1A y 1B. En otra modalidad, el equipo 100 puede utilizarse en conjunto con otros dispositivos de inmunoensayo, tales como para ELISA (ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas). En otra modalidad, el equipo 100 puede utilizarse en conjunto con una celda de prueba para dispositivo de inmunoensayo, como se describe en la Patente de EUA # 7,189,522 previamente incorporada.

[0044] De manera más particular, el agua 102 en el vial 101 puede mezclarse con el conjugado de látex secado por congelación 104 en el vial 103 al utilizar una pipeta 108a y transferir el agua al vial de látex. El vial 103 puede invertirse múltiples veces con el fin de dar lugar a que el conjugado de látex secado por congelación se reconstituya. El látex reconstituido puede almacenarse en un refrigerador si se desea. En una modalidad, el conjugado de látex secado es un conjugado de uno o más antígenos de influenza, tales como H1 y H3, con microperlas de látex. Las perlas de látex pueden ser de un color fácilmente visible, por ejemplo, azul.

[0045] Cuando se desea probar una muestra, la muestra, por ejemplo, sangre, puede obtenerse a partir de un paciente de la manera deseada, por ejemplo, una punción digital, al utilizar un dispositivo para recolección y transferencia de sangre 107, tal como un Minivette POCT fabricado por Sarstedt, Newton, North Carolina. La muestra de sangre puede transferirse al vial de diluyente 105 que contiene un diluyente 106, tal como heparina o EDTA. El conjugado de látex reconstituido entonces puede transferirse al vial de diluyente 105 al utilizar una pipeta 108b, y la sangre y conjugado de látex reconstituido pueden mezclarse al invertirse múltiples veces durante un período y también al dar a los anticuerpos en la sangre la oportunidad de capturarse por el conjugado de látex. Después de un mezclado suficiente y un período suficiente, el contenido del vial de diluyente y muestra 105 entonces puede transferirse con la pipeta 108c a una cámara de filtración 109, tal como una cámara de filtración GE Healthcare Life Sciences Mini-UniPrep que comprende un filtro 109a, compresor 109b, émbolo 109c y un tubo 109d, aunque pueden utilizarse otros mecanismos de filtración. Al utilizar el compresor manual 109b de la cámara de filtración, el filtro 109a puede entrar de lleno en la mezcla de muestra, y la muestra filtrada puede recolectarse en el tubo 109d de la cámara de filtración. Se apreciará que el filtro se elige para que tenga poros que son más pequeños que el tamaño de las perlas de conjugado de látex. Como resultado, las perlas de conjugado (con anticuerpos capturado, en su caso) se separan por filtración de la muestra, y la muestra (con anticuerpos que no se han capturado por el conjugado), con el diluyente y agua previamente agregados, se capturará en el tubo 109d. De esta manera, mientras el contenido del vial de diluyente y muestra 105 que se transfirió a la cámara de filtración 109 puede haber aparecido de azul oscuro (debido al conjugado de látex azul y la sangre), el contenido del tubo 109d debe ser rojo claro (el color de la sangre diluida). No obstante, se apreciará que los ligandos que están relacionados, pero no son los mismos que los ligandos de interés, se habrán removido de la muestra.

[0046] El contenido del tubo 109d entonces se transfiere por la pipeta 108d y se utiliza en conjunto con un dispositivo de inmunoensayo. En una modalidad, el dispositivo de inmunoensayo es un dispositivo del tipo por lo demás de la técnica anterior, tal como ELISA (ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas) o un ensayo LUMINEX, vendido por Thermo Fisher Scientific, Holtsville, NY. Cuando se dotan de una muestra que se procesa en esta forma, los resultados de los dispositivos de ELISA y LUMINEX se potencian. En otra modalidad, el dispositivo de inmunoensayo al cual se transfiere el contenido del tubo 109d, es una celda de prueba para dispositivo de inmunoensayo, tal como se describe en la Patente de EUA # 7,189,522 previamente incorporada, tal como al aplicar una cantidad seleccionada del contenido a la (segunda) ubicación para recibir la muestra líquida, esperar a que la muestra líquida alcance el sitio de prueba mediante la segunda trayectoria de migración, y luego aplicar regulador o un subsistema de regulador - conjugado a la primera ubicación para dar lugar a que un conjugado alcance el sitio de prueba mediante la primera trayectoria de migración. Cuando se dotan de una muestra que se procesa como se describe previamente, los resultados del dispositivo descrito en la Patente de EUA # 7,189,522, previamente incorporada, se potencian.

[0047] En otra modalidad, en vez de utilizar un equipo 100 con elementos tales como un vial de agua, un vial con conjugado de látex secado por congelación, un vial de diluyente, un ensamble de cámara de filtración, etc., el equipo incluye un conjugado que puede mantenerse en forma húmeda con o sin regulador, o puede mantenerse en un formato de conjugado seco por congelación el cual puede reconstituirse con agua y/o una solución reguladora. En una modalidad, el conjugado de látex comprende perlas de látex blanco con anticuerpos o antígenos conjugados a las mismas. La muestra y conjugado se mezclan en conjunto para permitir que el conjugado extraiga totalmente antígenos o anticuerpos interferentes. La muestra y conjugado mezclados entonces pueden aplicarse a una celda de prueba para dispositivo de inmunoensayo, tal como se describe en la

Patente de EUA # 7,189,522 previamente incorporada, tal como al aplicar una cantidad seleccionada del contenido a la (segunda) ubicación para recibir la muestra líquida, esperar a que la muestra y conjugado mezclados alcancen el sitio de prueba mediante la segunda trayectoria de migración, y luego aplicar regulador o un subsistema de regulador - conjugado a la primera ubicación para dar lugar a que un conjugado alcance el sitio de prueba mediante la primera trayectoria de migración. Cuando se dotan de una muestra que se procesa como se describe previamente, los resultados del dispositivo descrito en la Patente de EUA # 7,189,522, previamente incorporada, se potencian.

[0048] Al regresar a las Figuras 4A - 4C, se proporcionan modalidades adicionales que tienen como resultado que un aparato tenga una señal de la prueba potenciada. Las Figuras 4A - 4C se describen con referencia a dispositivos de prueba para VIH, aunque no se limitan a ello. Las modalidades de las Figuras 4A y 4B son similares a las de las Figuras 1, 1A y 1B, excepto que los conjugados proporcionados en las almohadillas 31b y 32b son diferentes, y el antígeno inmovilizado de línea de prueba es un anticuerpo contra VIH en vez de un anticuerpo contra influenza. De manera más particular, en la Figura 4A, el conjugado 41a en la trayectoria de migración de muestra 32 incluye una partícula de látex (por ejemplo, un látex blanco) a la cual se conjuga un anticuerpo para MAb-1 p24 y un primer agente de unión temporal (por ejemplo, antígeno de biotina). La línea de prueba se dota de una proteína de anticuerpo monoclonal anti-VIH (MAb-2 p24). El subsistema regulador-conjugado de la primera trayectoria de migración 30 se dota de un conjugado 39a que incluye un marcador (por ejemplo, látex azul o solución de oro) y un segundo agente de unión temporal (por ejemplo, estreptoavidina) conjugado al mismo, que se elige para unirse al primer agente de unión temporal. Con el sistema proporcionado, cuando una muestra que contiene antígeno de VIH p24 se agrega al aparato de prueba a través del orificio 26, el antígeno de VIH p24 en la muestra se unirá al MAb-1 p24 del conjugado, y la muestra con el antígeno de interés unido al conjugado viajará a la línea de prueba

donde el antígeno p24 de la muestra se capturará por el anticuerpo MAb-2 p24 en la línea de prueba. Cuando se agrega regulador a la primera tira absorbente a través del orificio 24, el conjugado de marcadores se moverá a la línea de prueba donde el primer agente de unión temporal se unirá con el segundo agente de unión temporal, y el marcador aparecerá en la línea de prueba.

[0049] La modalidad de la Figura 4B es muy similar a la modalidad de las Figuras 4A, excepto que, en lugar de que el segundo agente de unión temporal del conjugado 39a sea una proteína tetramérica, tal como estreptoavidina, el segundo agente de unión temporal es un anticuerpo anti-biotina. Como resultado, en casos donde la muestra contiene antígeno de VIH p24, en la línea de prueba, el antígeno de VIH p24 se retendrá en la línea de prueba por el anticuerpo MAb-2 p24 de la línea de prueba, y el conjugado de marcadores se unirá al primer conjugado, dado que el anticuerpo anti-biotina se unirá a la biotina que es parte del primer conjugado, como se observa en la Figura 4B

[0050] La modalidad de la Figura 4C asimismo es similar a las modalidades de las Figuras 4A y 4B, excepto que se utiliza una disposición de doble unión temporal. De manera más particular, el segundo material absorbente 32 se dota de una almohadilla 32c además de la almohadilla 32b. En una modalidad, la almohadilla 32b se dota del MAb-1 antígeno de VIH p24 conjugado con la biotina 41x, con la biotina actuando como primer agente de unión temporal de un primer par, y la almohadilla 32c se dota de partículas tales como partículas de látex blanco conjugadas con estreptoavidina y un antígeno secundario, tal como el FITC-A2 (isotiocianato de fluoresceína) 41y. La estreptoavidina de las partículas 41y actúan como segundo agente de unión temporal de un primer par, y el FITC-A2 actúa como primer agente de unión temporal de un segundo par. La almohadilla 31b se dota de un conjugado 39z que tiene un marcador al cual se conjuga un anticuerpo anti-FITC que actúa como segundo agente de unión temporal de un segundo par. Con la disposición proporcionada, si la muestra contiene un antígeno p24, cuando la muestra se

agrega al segundo material absorbente 32, el antígeno p24 se asociará al anticuerpo MAB-1 para VIH p24 con la biotina en la almohadilla 32b. A medida que la muestra progresa a lo largo de su trayectoria de migración hacia la almohadilla 32c, la biotina se unirá a la estreptoavidina del conjugado 41y, es decir, el primer y segundo agentes de unión temporal del primer par se unen en conjunto, y al complejo del antígeno p24 - anticuerpo MAB-1 para VIH p24 con el conjugado biotina - estreptoavidina/látex blanco/antígeno FITC 41y se moverá al sitio de prueba que incluye el anticuerpo MAB-2 para VIH p24. En el sitio de prueba, el antígeno p24 de la muestra se unirá al anticuerpo MAB-2 para VIH p24 del sitio de prueba, y todo el complejo previamente descrito se mantendrá en el sitio de prueba. Cuando el regulador se agrega luego a la primera trayectoria de migración y el conjugado marcador-anticuerpo anti-FITC se mueve al sitio de prueba, el anticuerpo anti-FITC se unirá al FITC-A2 que se mantiene en el sitio de prueba, es decir, el primer y segundo agentes de unión temporal del segundo par se unen en conjunto. Como resultado, el marcador se mantendrá en la línea de prueba y proporcionará un resultado de prueba positivo.

[0051] Las modalidades de las Figuras 4A a 4C pueden utilizarse en su totalidad en conjunto con una muestra que se proporciona directamente al aparato, o con una muestra tal como la muestra descrita previamente, contenida en el tubo 109d, lo cual ha resultado de una muestra que se ha mezclado previamente con un conjugado de extracción total para antígenos o anticuerpos diferentes pero relacionados con el antígeno o anticuerpo de interés, y luego se ha filtrado. En todos los casos, las moléculas y conjugados en las almohadillas 32b y 31b, y 32c (si se presenta), se seleccionan apropiadamente, como también las moléculas en la línea de prueba 50 y el conjugado de extracción total seco por congelación 104.

[0052] En el presente documento se han descrito e ilustrado varias modalidades de inmunoensayos y métodos para su uso. Aunque se han descrito modalidades

particulares, no se pretende que las reivindicaciones se limiten a ello, sino se pretende que las reivindicaciones sean tan amplias en su alcance como la técnica lo permita, y que la especificación se lea de la misma manera. De esta manera, mientras la especificación expone la unión a ligandos al utilizar reacciones antígeno/anticuerpo, otros mecanismos de unión a ligandos, tales como unión a aptámeros, unión a ácidos nucleicos, unión enzimática, etc., también pueden utilizarse. También, aunque las celdas de prueba se describen con una sola línea para detectar un solo ligando, se apreciará que pueden utilizarse dos o más líneas para detectar más de un ligando. Además, mientras las celdas de prueba se describen con orificios en la pared superior de un alojamiento para recibir la muestra y el subsistema de regulador-solución o regulador-conjugado, se apreciará que uno o ambos orificios pueden proporcionarse en la pared de extremo o pared lateral del alojamiento. De igual forma, mientras el material absorbente se describió incluyendo de preferencia un refuerzo de plástico delgado, se apreciará que el refuerzo de plástico puede proporcionarse sólo en ciertas ubicaciones o no proporcionarse en absoluto. En casos donde sólo se proporcionan refuerzos parciales o no se proporcionan, los sitios de prueba y control pueden ubicarse en cualquiera o ambos lados del material absorbente. Más aún, aunque una tira de prueba y tira de control se muestran rectangulares en su configuración (es decir, líneas), se apreciará que los sitios de prueba y control pueden configurarse de manera diferente, tal como en círculos, cuadrados, óvalos, una línea interrumpida, etc. De hecho, el sitio de prueba y sitio de control pueden configurarse de manera diferente entre sí.

[0053] Los expertos en la técnica también apreciarán que el alojamiento puede modificarse en formas adicionales para incluir ventanas separadas para cada línea de prueba. También, mientras las modalidades se describieron en conjunto con el uso de una solución reguladora, la cual se agrega a la trayectoria de migración del conjugado y, opcionalmente, a la trayectoria de migración de la muestra, se apreciará que uno o más

reguladores pueden elegirse, según se desee, para agregarse a las trayectorias de migración, lo que depende de la prueba o pruebas a realizarse. De esta manera, a menudo se utilizan reguladores, tales como reguladores de fosfato o reguladores de TRIS (tris hidroximetilaminometano). Sin embargo, las modalidades pretenden abarcar el uso de cualquier diluyente, incluyendo agua. Además, el diluyente, si es necesario, puede agregarse y mezclarse con la muestra antes de agregar la muestra al material absorbente, o la muestra puede depositarse primero y el diluyente puede agregarse después de ello. Asimismo, puede utilizarse cualquier diluyente capaz de dar lugar a que el conjugado de la trayectoria “no de muestra” migre, y puede premezclarse con el conjugado en un sistema de conjugado líquido, o proporcionarse a la trayectoria de migración para el conjugado en un sistema de conjugado seco.

[0054] Los expertos en la técnica también apreciarán que, aunque las modalidades se describieron con referencia particular a la detección de un anticuerpo contra influenza y antígeno de VIH p-24, el aparato y los métodos pueden ser útiles en la detección de otros anticuerpos o antígenos, ya sea de humanos o animales. También, mientras las modalidades se describieron con referencia particular al uso de sangre como muestra, se apreciará que pueden utilizarse otros fluidos o excreciones corporales, o porciones de la sangre, incluyendo, pero sin limitarse a, orina, heces, saliva, esputo, suero sanguíneo (plasma), etc. Por lo tanto se apreciará, por los expertos en la técnica, que pueden hacerse aún otras modificaciones sin desviarse del espíritu y alcance de las reivindicaciones.