(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 812 629**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/554 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01)
C12M 1/38 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2005 E 15184922 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2985349**

(54) Título: **Dispositivo para la detección de analitos**

(30) Prioridad:

24.11.2004 US 630152 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2021

(73) Titular/es:

TECHLAB, INC. (100.0%)
2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060, US

(72) Inventor/es:

BOONE, JAMES, H.;
LYERLY, DAVID, M. y
WILKINS, TRACY, D.

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la detección de analitos

REFERENCIA A APLICACIONES RELACIONADAS

La solicitud se ampara en, y reivindica el beneficio de la fecha de divulgación y presentación de la solicitud de patente provisional en EE.UU. número 60/630,152, presentada el 24 de noviembre de 2004.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo técnico de la Invención

La presente invención se refiere a dispositivos para detectar sustancias que están presentes en líquidos. En particular, la invención se refiere a dispositivos para detectar moléculas pequeñas, tales como productos químicos o biológicos, que están presentes en muestras líquidas obtenidas de tejidos corporales o del entorno.

Descripción de la técnica relacionada

Existen diversos tipos de dispositivos y métodos disponibles en la técnica para detectar sustancias en muestras. Gran parte del sector utiliza moléculas unidas a una membrana, que se unen específicamente a la sustancia de interés o a una molécula que está unida a la sustancia de interés. Los dos tipos principales de dispositivos y métodos se denominan, en general, de flujo lateral y de flujo paralelo. Estas pruebas son generalmente relativamente rápidas (menos de 1 hora para detectar una sustancia) y sensibles (en el intervalo de ng/ml).

En un dispositivo de flujo paralelo, una muestra se hace pasar por una membrana por capilaridad y la sustancia (analito, antígeno, etc.) es retenida en la membrana al unirse a un anticuerpo, receptor, péptido, etc., específico. La unión se detecta mediante la unión de un segundo anticuerpo u otra molécula que se acopla a cualquiera de una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), una partícula coloidal (por ejemplo, oro coloidal) o algunos otros marcadores y partículas (por ejemplo, marcadores fluorescentes, microesferas paramagnéticas). La unión se produce muy rápidamente dado que se hace pasar la muestra por la membrana, y a continuación se lava la membrana (se hace pasar un tampón químico por la membrana), y se añade el reactivo de detección. El resultado es una señal detectable, tal como un punto de color, una línea, un signo más, etc.

En un dispositivo de flujo lateral, la muestra se infiltra por capilaridad a través de una membrana delgada y fluye a través de una línea de un reactivo, tal como un anticuerpo u otro componente de unión (péptidos de unión, receptores, etc.). En ciertas versiones, al analito se ha unido ya un anticuerpo con una partícula coloreada acoplada (por ejemplo, oro coloidal, microesferas Blue Dextran, etc.). Este complejo de antígeno y anticuerpo-oro es ligado por la línea del reactivo y aparece una línea coloreada. No hay lavado involucrado y no se utilizan reactivos líquidos, excepto porque la muestra puede ser diluida en una solución tamponada antes de ser colocada en la placa del conjugado, que contiene anticuerpo-oro coloidal como un reactivo seco.

En otras versiones del dispositivo de flujo lateral, la muestra se mezcla normalmente con un tampón que contiene un conjugado anticuerpo-enzima. Esta se coloca sobre la membrana y se produce infiltración por flujo lateral a lo largo de la membrana delgada. La línea no es visible inmediatamente debido a que es necesario añadir un reactivo. Normalmente, se trata de una sustancia química incolora que es transformada por la enzima en un precipitado coloreado insoluble (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, etc.). Esta versión requiere lavado para filtrar la enzima no unida, de manera que hay una placa absorbente en cada extremo de la membrana, y la membrana es habitualmente más porosa de la que se utiliza para el flujo lateral de oro coloidal (esto facilita el lavado). La memoria WO 00/20862 dar a conocer un proceso y un aparato para la detección in vitro de múltiples analitos.

Si bien los dispositivos y métodos disponibles actualmente para detectar sustancias en muestras líquidas son adecuados y eficaces para detectar la mayoría de las sustancias de interés, existe la necesidad de nuevos dispositivos y métodos que tengan una velocidad, una sensibilidad y una facilidad de uso mejoradas.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención trata las necesidades de la técnica dando a conocer un dispositivo para detectar rápidamente sustancias en muestras líquidas, que es sensible y fácil de utilizar. La patente describe asimismo un método para detectar rápidamente sustancias en muestras líquidas, que es sensible y fácil de utilizar. El presente dispositivo permite al personal clínico detectar rápidamente organismos, productos biológicos tales como toxinas u otros materiales biológicos tales como proteínas, ácidos nucleicos (ADN, ARN) y polisacáridos, y fármacos u otros químicos fabricados por el hombre, en muestras de tejido. Por muestras de tejido se entiende cualquier composición que contenga material biológico que se origina en una o varias células animales o tejidos (incluyendo el aparato circulatorio), incluyendo, de forma no limitativa, tejidos (por ejemplo, sangre total o fracciones de la misma; tejido tumoral, orina, excrementos o productos de excreción, tales como heces, diarrea) de humanos y animales (por ejemplo, muestras veterinarias de animales de granja o de animales de compañía, carne destinada al consumo humano, tal como hamburguesas, filetes, beicon, huevos, alimentos preparados). Estas incluyen por lo tanto muestras líquidas o semilíquidas de materiales biológicos que no requieren dilución antes de su utilización en el método de la invención. Esto permite asimismo la detección de sustancias biológicas o químicas en muestras

ambientales, incluyendo el suelo superficial, el subsuelo, rocas y agua, y agua superficial. Además, pueden ser utilizados para detectar sustancias aerotransportadas cuando dichas sustancias son capturadas y disueltas en un líquido. Por ejemplo, los aerosoles se pueden solubilizar o combinar de otro modo con un líquido para crear una composición líquida, que puede ser utilizada como una muestra para la detección de una sustancia de interés.

En general, el método asociado con el dispositivo de la invención utiliza la difusión de una sustancia a través de una membrana para permitir la detección, ya sea directa o indirectamente, de dicha sustancia mediante un elemento de par de unión específico. A diferencia de los métodos de detección actualmente en uso, que dependen del paso, de manera unidireccional, de una sustancia sobre, o a través de una membrana que contiene un elemento de par de unión específico para la sustancia, los presentes métodos no dependen de dicho paso unidireccional de la sustancia sobre, o a través de una membrana. Por el contrario, los presentes métodos dependen de la simple difusión de una sustancia por medio de, alrededor de, sobre, a través y en torno a una membrana para detectar la sustancia, sin que sea necesaria ninguna direccionalidad uniforme del movimiento con respecto a la membrana. Sorprendentemente, se ha descubierto que la simple difusión por medio de, alrededor de, sobre, a través y/o en torno a una membrana que contiene un elemento de par de unión específico para una sustancia de interés es suficiente para la detección rápida y sensible de la sustancia.

Por consiguiente, el método descrito en la patente comprende, en general, disponer un líquido que contiene, o presuntamente contiene, una sustancia de interés; aplicar el líquido a un material poroso, tal como una placa, en cantidad suficiente para humedecer, por lo menos parcialmente, el material poroso; poner en contacto el material poroso con una membrana porosa que comprende un elemento de par de unión específico que puede unir, ya sea directa o indirectamente, la sustancia de interés; y detectar la presencia o ausencia de un complejo que comprende el elemento de par de unión específico y la sustancia de interés, donde la presencia o ausencia de dicho complejo indica la presencia de la sustancia en el líquido.

Más específicamente, el dispositivo de la invención permite que una muestra que contiene, o presuntamente contiene, una sustancia de interés sea retenida en un área o zona predefinida del dispositivo, donde el área o zona comprende una membrana porosa que comprende un elemento de par de unión específico que es específico, ya sea directa o indirectamente, para la sustancia. En el interior de este área, la muestra se puede difundir a través de, por, etc., la membrana.

La invención da a conocer un dispositivo según la reivindicación 1. El dispositivo puede comprender un soporte para la membrana porosa. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende el recipiente y el soporte en contacto entre sí, haciendo el contacto entre los dos elementos que la membrana porosa y el material poroso estén en contacto directo entre sí sobre por lo menos una parte de la membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico. El dispositivo comprende una placa de aplicación de muestras y una placa de recepción de la solución de lavado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras adjuntas, que se incorporan a esta memoria y forman parte de la misma, muestran varias realizaciones de la invención y junto con la descripción escrita, sirven para explicar ciertos principios de la invención. Las figuras proporcionan detalles de ciertas realizaciones de la invención para ayudar a explicar mejor diversas características de las realizaciones descritas. Debido a que las figuras representan solamente realizaciones a modo de ejemplo de la invención, no se debe interpretar que limitan el alcance de la invención a los detalles particulares descritos en las mismas.

La figura 1 es una vista en perspectiva de una configuración básica de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, que comprende una membrana porosa y un receptáculo.

La figura 2 es una vista en perspectiva de una configuración del dispositivo representado en la figura 1, en la que la membrana porosa está en contacto directo con el material poroso.

La figura 3 es una vista lateral en sección transversal de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, que comprende un recipiente y un soporte conectados directamente entre sí por medio de una articulación flexible.

La figura 4A es una vista lateral en sección transversal de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en el que una placa de recepción de la solución de lavado está conectada a una placa de recepción de la muestra y de reacción.

La figura 4B es una vista lateral en sección transversal de una configuración alternativa del dispositivo representado en la figura 4A, en la que la placa de recepción de la solución de lavado está situada por debajo de la placa de recepción de la muestra y de reacción.

La figura 4C es una vista lateral en sección transversal de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en el que una barrera impermeable al líquido, extraíble, está situada entre de una placa de reacción de la muestra y de reacción y una placa de recepción de la solución de lavado.

La figura 5 representa una vista lateral de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en el que la placa de recepción de la muestra y de reacción se extiende más allá del

área de reacción, para formar una unidad que comprende un área independiente de recepción de la muestra y un área de reacción.

La figura 6 representa una vista lateral en sección transversal del dispositivo representado en la figura 5, contenido en el interior de un recipiente que comprende un orificio de aplicación de muestras y una ventana de visualización.

La figura 7 representa una vista lateral en sección transversal de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, que comprende un orificio de aplicación de muestras y una ventana de visualización.

La figura 8 representa una vista lateral en sección transversal de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en el que el soporte para la membrana porosa ejerce presión sobre la placa de reacción en la posición de la membrana para provocar la compresión de la placa en este área.

La figura 9 representa una vista lateral en sección transversal de una configuración del dispositivo de la invención, en la que el recipiente ejerce presión sobre la placa de reacción desde debajo en la posición de la membrana, para provocar la compresión de la placa en este área.

La figura 10 representa una vista superior de una configuración del dispositivo de la invención, que muestra un orificio de aplicación de muestras y una ventana de visualización.

La figura 11 representa una vista superior de una configuración alternativa del dispositivo de la invención, que muestra un orificio de aplicación de muestras y una ventana de visualización.

La figura 12 representa una vista superior del dispositivo representado en la figura 11, con áreas que comprenden elementos de par de unión específicos y/o moléculas de control en la membrana en el interior del área definida por la ventana de visualización.

La figura 13 representa una vista superior en sección transversal de una configuración del dispositivo de la invención, que muestra una única placa de aplicación de muestras que se bifurca en dos placas de reacción y membranas porosas independientes, que están conectadas a dos placas de recepción de la solución de lavado independientes.

La figura 14A representa una vista superior de una configuración del dispositivo de la invención, en la que la misma placa de aplicación de muestras se extiende más allá del área definida por el recipiente.

La figura 14B representa una vista lateral en sección transversal de una realización de la configuración del dispositivo de la invención representado en la figura 14A.

La figura 14C representa una vista lateral en sección transversal de una realización de la configuración del dispositivo de la invención representado en la figura 14A.

La figura 15A es una vista lateral de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en el que se utiliza un recipiente de "concha de almeja".

La figura 15B es una vista superior de la mitad inferior del dispositivo representado en la figura 15A.

La figura 15C es una sección transversal desde el lateral del dispositivo representado en la figura 15A, en la que la mitad superior está situada sobre, pero no en contacto con la mitad inferior, y donde se ha retirado la articulación para permitir el alineamiento de las mitades superior e inferior con propósitos descriptivos.

La figura 15D es una sección transversal desde el lateral del dispositivo representado en la figura 15A, en la que la mitad superior y la mitad inferior están unidas mediante ajuste por fricción.

La figura 16 representa una vista lateral en sección transversal de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en la que el dispositivo comprende dos secciones conectadas por una articulación.

La figura 17 representa una sección transversal lateral de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en la que el dispositivo comprende una barrera impermeable.

La figura 18 representa una sección transversal lateral de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en la que el dispositivo comprende una barrera impermeable.

La figura 19 representa una sección transversal lateral de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en la que el dispositivo comprende una articulación que conecta las mitades superior e inferior. El panel A representa el dispositivo en una posición cerrada para la aplicación y unión de las muestras. El panel B representa el dispositivo en una posición abierta para leer los resultados de la reacción.

La figura 20 representa una sección transversal lateral de una configuración de un dispositivo que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1, en la que el dispositivo comprende un orificio de aplicación en la parte interior del dispositivo y una placa de recepción de la solución de lavado en el lateral.

La figura 21A representa una vista superior de una configuración del dispositivo de la invención, tal como se vería cuando se detecta una muestra positiva.

La figura 21B representa una vista superior de una configuración del dispositivo de la invención, tal como se vería cuando se detecta una muestra negativa.

La figura 21C representa una vista superior de una configuración del dispositivo de la invención, cuando el dispositivo y/o el método han fallado.

La figura 21D representa una vista superior de una configuración del dispositivo de la invención, cuando el dispositivo y/o el método han fallado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Antes de proceder con una descripción de la invención y de diversas realizaciones, se definirán en este momento ciertos términos utilizados en la presente memoria. Otros términos utilizados en la presente memoria se utilizan de acuerdo con su definición normal en la técnica o se definen en algún otro lugar en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una sustancia es cualquier cosa, lo que incluye, pero no necesariamente se limita a, moléculas orgánicas naturales, simples, tales como azúcares y ácidos de cadena corta; moléculas biológicas complejas tales como péptidos, ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARN, APN) y polisacáridos; y moléculas sintéticas (ya sea mediante la manipulación de procesos biológicos o mediante síntesis química) tales como fármacos, agentes industriales, pesticidas y defoliantes. Por lo canto, una sustancia puede ser un fármaco, una hormona (tal como una presente durante el embarazo o en la ovulación), una proteína (incluyendo anticuerpos), una toxina, ADN (incluyendo ADN monocatenario), ARN (incluyendo ARN bicatenario), un virus o una proteína viral o un ácido nucleico viral, una bacteria o una proteína bacteriana o un ácido nucleico bacteriano, un polisacárido, un contaminante y similares. Por lo tanto, puede ser un patógeno bacteriano o viral, o un parásito procariótico o eucariótico.

Por ejemplo, la sustancia puede ser un organismo vivo o un virus, o cualquier parte de los mismos, incluyendo, de forma no limitativa, macromoléculas. Por lo tanto, la sustancia puede ser un organismo procariótico Gram positivo o de grano negativo, tal como Eubacterium o Archaea. Ejemplos no limitativos de organismos bacterianos incluyen una especie de Clostridium, tal como C. difficile, C. tetani, C. botulinum y C. perfringens; Escherichia coli; una especie de Salmonella, tal como Salmonella typhimurium y Salmonella typhi; una especie de Bacillus, tal como Bacillus anthracis y B. cereus; una especie de Staphylococcus, tal como S. aureus y S. epidermidis; una especie de Streptococcus, tal como S. pyogenes, S. mutans y S. pneumoniae; una especie de Neisseria, tal como N. meningitidis y N. gonorrhoeae; una especie de Haemophilus, tal como H. influenzae; una especie de Bordetella, tal como B. pertussis, B. parapertussis y B. bronchiseptica, una especie de Listeria, tal como L. monocytogenes; una especie de Cognebacterium, tal como C. diphtheriae y C. pseudotuberculosis; una especie de Mycobacterium, tal como M. tuberculosis, M. bovis, M. scrofulaceum, M. avium-intracelular y M. leprae; una especie de actinomiceto; una especie de Klebsiella, tal como K. pneumoniae; una especie de Serratia, tal como S. marcescens; una especie de Proteus, tal como P. mirabilis y P. vulgaris; una especie de Shigella, tal como S. flexneri; una especie de Vibrio, tal como V. cholerae; una especie de Pseudomonas, tal como P. aeruginosa; una especie de Yersinia, tal como Y. pestis; una especie de Francisella, tal como F. tularensis; una especie de Brucella, tal como B. abortus, B. suis y B. canis; una especie de Treponema, tal como T. pallidum; una especie de Borrelia, tal como B. burgdorferi; una especie de Campylobacter, tal como C. jejuni y C. fetus; una especie de Legionella, tal como L. pneumophila; una especie de Rickettsiae; una especie de Chlanzydia, tal como C. trachomatis y C. psittaci; y una especie de Mycoplasma o una especie de Acholeplasma.

Por supuesto, la sustancia puede ser un virus o cualquier parte del mismo. Ejemplos no limitativos de virus incluyen virus de inmunodeficiencia, tales como virus de inmunodeficiencia humana (por ejemplo, HIV-1, HIV-2, HIV-O); virus de la hepatitis, tales como virus de hepatitis C (HCV), y virus de hepatitis B (HBV); virus de papiloma; tales como virus de papiloma humano (HPV); y cualquier otro virus asociado con enfermedades humanas o animales.

Dado que la sustancia puede ser cualquier parte de un organismo vivo o no vivo, la sustancia puede ser una proteína o una parte de la misma asociada con una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Alzheimer o una encefalopatía espongiforme transmisible, tal como una enfermedad priónica. Por lo tanto, la sustancia puede ser una proteína priónica o una parte de la misma.

Otros ejemplos no limitativos de sustancias incluyen parásitos o cualquier parte de los mismos. Por lo tanto, las sustancias pueden ser la totalidad o parte de una especie de Giardia, una especie de Cryptosporidium o una especie de Entamoeba.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un elemento de par de unión específico es una sustancia que se une específicamente, ya sea directa o indirectamente, a otra sustancia. Por lo tanto, conjuntamente, el elemento de par de unión específico y la otra sustancia crean un par de sustancias. Debido a que las dos sustancias se unen específicamente entre sí, ambas pueden ser consideradas elementos de par de unión específicos entre ellas. Sin embargo, para mayor claridad, una se denominará el elemento de par de unión específico y la otra la sustancia a la que éste se une. En la invención, uno o varios del elemento o elementos de par de unión específicos es un anticuerpo. Los elementos de par de unión específicos pueden incluir pares anticuerpo-antígeno (que incluyen, de forma no limitativa, pares anticuerpo-anticuerpo donde un anticuerpo se une específicamente a otro anticuerpo) o anticuerpos artificiales (por ejemplo, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos recombinantes, anticuerpos que contienen exactamente la zona de unión del antígeno, anticuerpos producidos de manera bacteriana o partes de anticuerpos). La invención está dirigida a la detección de sustancias en una muestra. Sin embargo, no se debería asumir que la sustancia es necesariamente uno de los elementos de par de unión específicos. Por el contrario, un elemento de par de unión específico puede ser una sustancia que reacciona específicamente con otro elemento de par de unión específico, y al mismo tiempo se une a una sustancia de interés en la muestra (por ejemplo, un anticuerpo que se une a una sustancia de interés y al cual se une al mismo tiempo específicamente otro anticuerpo). Tal como se utiliza en la presente memoria, la descripción de un elemento de par de unión específico que se une a

una sustancia de interés en una muestra incluye no sólo la unión del elemento de par de unión específico a la sustancia particular, sino a otro elemento de par de unión específico que está unido a la sustancia.

Los dispositivos y métodos de pruebas rápidas utilizados actualmente en la técnica funcionan debido a que fuerzan la reunión de una sustancia (por ejemplo, un antígeno) y un elemento de par de unión específico, ya sea aspirando la muestra por una membrana recubierta con el anticuerpo (dispositivos y métodos de flujo paralelo) o haciendo que la misma pase por capilaridad por una membrana (dispositivos y métodos de flujo lateral). La presente invención no depende de ninguno de estos principios. De acuerdo con la presente invención, una membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico simplemente tiene que contactar con un material poroso (por ejemplo, una placa) que contiene la sustancia. La simple difusión entrando y saliendo del material poroso y de la membrana hace que la sustancia y el elemento de par de unión específico entren en contacto. Que la presente invención de a conocer una prueba rápida y sensible para sustancias en muestras es sorprendente debido a que se considera generalizadamente que la simple difusión no es suficiente para la detección de una sustancia, mucho menos para la detección con alta sensibilidad por medio de la unión de un elemento de par de unión específico asociado con un soporte sólido, tal como una membrana. Sin duda, la presente invención da a conocer una detección excepcionalmente sensible de sustancias, a veces comparable a la utilizada por los dispositivos y métodos de flujo lateral o de flujo paralelo. Dado que no es necesario aplicar directamente la muestra a la membrana que comprende el elemento de par de unión específico, y que no necesariamente fluye directamente a través de la misma, la prueba puede ser utilizada asimismo en muestras que obstruyen las membranas de otras pruebas rápidas.

En un primer aspecto, la presente invención da a conocer un dispositivo útil para llevar a cabo un método de detección de una sustancia que está presente en una muestra de líquido. El método de detección utiliza la difusión pasiva de una sustancia desde un receptáculo que comprende un material poroso, tal como una placa, a una membrana porosa. Dicha difusión permite la detección, ya sea directa o indirectamente, de la sustancia mediante un elemento de par de unión específico asociado con la membrana porosa. A diferencia de los métodos comunes de detección actualmente en uso, que dependen del paso, de manera unidireccional, de una sustancia a través de, o por una membrana que contiene un elemento de par de unión específico para la sustancia, los presentes métodos no dependen de dicho movimiento unidireccional de la sustancia. Por el contrario, los presentes métodos dependen de la simple difusión de una sustancia por, alrededor de, sobre, a través y/o en torno a una membrana para detectar la sustancia, sin que sea necesaria ninguna direccionalidad única del movimiento con respecto a la membrana. Sorprendentemente, se ha descubierto que la simple difusión por medio de, alrededor de, sobre, a través y en torno a una membrana que contiene un elemento de par de unión específico para una sustancia de interés es suficiente para la detección rápida y sensible de la sustancia.

El método descrito en la patente comprende, en general, proporcionar un líquido que comprende, o se sospecha que comprende una sustancia de interés; aplicar el líquido a un material poroso en una cantidad suficiente para humedecer, por lo menos parcialmente, el material poroso; poner en contacto el material poroso con una membrana porosa que comprende un elemento de par de unión específico que puede unir, ya sea directa o indirectamente, la sustancia de interés; mantener el material poroso humedecido y la membrana porosa en contacto durante una cantidad de tiempo suficiente para que la membrana porosa se humedezca, por lo menos en el área que comprende el elemento de par de unión específico; y detectar la presencia o ausencia de un complejo que comprende el elemento de par de unión específico y la sustancia de interés, donde la presencia de dicho complejo indica la presencia de la sustancia en el líquido.

El líquido que comprende, o se sospecha que comprende, una sustancia de interés se puede proporcionar de muchas maneras. Por ejemplo, se puede proporcionar en la forma en que está aislado de su entorno natural (por ejemplo, sangre total, orina, heces diarreicas y agua corriente, de río o de lago pueden ser utilizados directamente estando aislados). Por lo tanto, puede ser una muestra no diluida. Alternativamente, se puede proporcionar en una forma después de haber sido tratada para eliminar uno o varios componentes (por ejemplo, puede ser utilizada la parte líquida de la sangre y de las heces después del centrifugado, filtración o precipitación de materia sólida). Además, cuando la muestra original es sólida o sustancialmente sólida, se puede añadir a la muestra un líquido, tal como agua, para proporcionar características líquidas. Se puede llevar a cabo otro tratamiento o manipulación del líquido antes de, o en el momento de la provisión de líquido. Se puede utilizar cualquier tratamiento o manipulación siempre que no incapacite a la muestra para ser utilizada en el método de la invención o en el dispositivo de la invención.

El líquido puede ser cualquier líquido incluyendo, de forma no limitativa, agua o composiciones que contengan agua, tales como tejidos biológicos, extractos de tejidos biológicos, y excreciones biológicas, solventes orgánicos o composiciones que contengan solventes orgánicos, y combinaciones de agua y solventes orgánicos o combinaciones de composiciones acuosas y/o de solventes orgánicos. Por ejemplo, el líquido puede ser un fluido biológico, tal como sangre o una parte de la sangre, orina, heces, saliva, esputos, mucosa, semen o tejido homogeneizado. Por lo tanto, puede ser una muestra homogeneizada de tejido humano o animal, tal como carne homogeneizada (por ejemplo, hamburguesa, cordero, cerdo, pollo, pescado, huevos). Puede ser asimismo un extracto de un espécimen sólido, tal como un extracto acuoso de una muestra fecal o de una muestra de carne consumible. Cuando el tejido a analizar no es adecuado para su licuefacción aislado, se puede añadir agua u otro

líquido al tejido para proporcionar características líquidas adecuadas. Dado que la presente invención es adecuada para la detección de sustancias en líquidos que tienen una amplia gama de viscosidades, el presente método es adecuado para detectar sustancias presentes en composiciones líquidas o semilíquidas.

Cuando sea necesario, se puede ajustar la cantidad o la concentración de la sustancia a detectar en el líquido, si está presente, para conseguir una detección satisfactoria. El ajuste se puede conseguir mediante la dilución de un líquido que sea compatible con la muestra líquida y los componentes del dispositivo de la invención, o se puede conseguir mediante la concentración de la sustancia dentro de la muestra líquida utilizando cualquier técnica de concentración adecuada que incluye, pero sin limitarse a, centrifugado, filtración, evaporación, purificación por afinidad o similares. En general, la sustancia a detectar está presente en la muestra en cantidades de nanogramos (ng) a microgramos (ug).

Se pueden añadir asimismo componentes adicionales al líquido antes, o en el momento de la aplicación del líquido al material poroso. Se puede añadir al líquido cualquier cosa que no interfiera sustancialmente con la capacidad del elemento de par de unión específico para formar un complejo específicamente con la sustancia o con un elemento de par de unión específico que se una a la sustancia. En algunas realizaciones, un marcador que interactúe específicamente con la sustancia, si está presente, se añade al líquido antes, o en el momento de la aplicación del líquido al material poroso. Por ejemplo, se puede añadir al líquido antes de la aplicación del líquido al material poroso un anticuerpo que se una específicamente con la sustancia de interés. El anticuerpo se puede marcar con una fracción que pueda ser detectada, ya sea directamente o mediante la utilización de materiales auxiliares. Fracciones a modo de ejemplo incluyen, de forma no limitativa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, compuestos fluorescentes, microesferas paramagnéticas, oro u otros metales, microesferas de látex, avidina (estreptavidina), y biotina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un conjugado del anticuerpo, que se une específicamente a la sustancia de interés, se añade a la muestra líquida antes, o en el momento de la aplicación de la muestra líquida al material poroso/placa.

El líquido se aplica al material poroso en una cantidad suficiente para humedecer, por lo menos parcialmente, el material poroso. Se aplica una cantidad suficiente de líquido para humedecer la parte del material poroso que está en contacto con la membrana porosa en la zona en la que está situado el elemento de par de unión específico. En realizaciones preferidas, se humedece todo el material poroso o sustancialmente todo el material poroso. El material poroso se extiende más allá del área cubierta por la membrana porosa y se aplica una cantidad suficiente de líquido para humedecer la membrana porosa, por lo menos, en una zona en la que está situado el elemento de par de unión específico.

La aplicación se puede conseguir mediante cualquier técnica adecuada, que incluye, de forma no limitativa, sumergir el material poroso en el líquido, verter el líquido sobre el material poroso, colocar el material poroso en la trayectoria de un flujo de líquido (por ejemplo, sumergirlo en el caudal de un río, introducirlo en un flujo de orina), dejar caer el líquido sobre el material poroso (por ejemplo, con un cuentagotas o una pipeta) y untar una muestra semilíquida sobre el material poroso. La aplicación se puede conseguir mediante la aplicación directa al material poroso, o mediante otro material poroso en contacto con el material poroso. Análogamente, se puede conseguir mediante la aplicación a un área del material poroso que está físicamente alejada de otra posición, y permitiendo que líquido migre a través del material poroso hasta la otra posición.

En la práctica de la invención, por lo menos una parte del líquido que se aplica debería estar presente en una posición directamente en contacto con una parte de la membrana que comprenda un elemento de par de unión específico. Por lo tanto, el líquido se puede aplicar a una parte del material poroso adyacente al área en la que la membrana porosa está en contacto con el material poroso, o se prevé esté en contacto con el material poroso (por ejemplo, en el área de la placa de reacción, que incluye la posición o área de detección) o se puede aplicar en una posición distal respecto del área de la placa de reacción, y permitir que migre a dicha área. Cuando se aplica en una posición distal, debido a la porosidad del material, el líquido se desplazará a través del material poroso desde la posición de aplicación hasta la posición de detección de la presencia de la sustancia (es decir, hasta la posición en el material poroso con la que la membrana porosa está en contacto).

Aplicar el líquido en una posición alejada de la posición de detección puede permitir la filtración del líquido antes de la detección de la sustancia. Es decir, el material poroso puede actuar no sólo para transportar el líquido y sus componentes a la posición de detección, sino que pueda actuar asimismo para bloquear o retardar la migración de ciertos componentes presentes en la muestra, actuando por lo tanto de manera efectiva como un sistema de filtración que permite que sólo las sustancias de cierto tamaño migren al área de detección. Están disponibles muchos materiales porosos diferentes, que tienen varios tamaños de poro diferentes, y se puede seleccionar el material y el tamaño de poro adecuados para filtrar de manera efectiva componentes no deseados en el líquido. Por ejemplo, cuando se aplica un líquido que comprende heces, se puede desear filtrar las partículas grandes, tales como bacterias o alimentos no digeridos o digeridos parcialmente. En esta situación, se puede seleccionar un material poroso que tenga un tamaño de poro que bloquee o retarde significativamente la migración de estos componentes relativamente grandes, permitiendo al mismo tiempo que los componentes menores, tales como proteínas bacterianas, ácidos nucleicos, proteínas extracelulares de la sangre o similares, migren esencialmente sin impedimento a través del material.

La patente describe un método que comprende poner en contacto el material poroso con una membrana porosa que comprende un elemento de par de unión específico que es apto para una unión, ya sea directamente o indirectamente, con la sustancia de interés. Poner en contacto el material poroso y la membrana porosa se puede producir antes o después de aplicar el líquido al material poroso. Además, no es relevante si para efectuar el contacto se hace que se mueva el material o la membrana. La puesta en contacto comprende desplazamiento físico de uno o ambos del material poroso y de la membrana porosa para conseguir el contacto.

Aunque no es necesario, cuando el líquido se va a aplicar a un material poroso en una posición alejada de la posición de detección de la presencia de la sustancia, habitualmente el material poroso y la membrana porosa se ponen en contacto entre sí antes de la aplicación del líquido. Por otra parte, cuando el líquido se aplica al material poroso muy cerca de la posición en la que el material poroso y la membrana porosa entran en contacto, el líquido se aplica habitualmente antes de que la membrana y el material entren en contacto.

Se ha descubierto que el contacto directo de la membrana en la posición en la que está situado el elemento de par de unión específico, con un material poroso a través del cual se puede desplazar una sustancia de interés, mejora la sensibilidad y la velocidad del método. Por lo tanto, la membrana porosa y el material poroso están en contacto en esta posición, o por lo menos sobre una parte de esta posición. El contacto entre el material poroso y la membrana porosa debería ser un contacto continuo sobre, por lo menos, la parte de la membrana en la que está situado el elemento de par de unión específico, o sobre una parte suficiente de la membrana en la posición en la que está situado el elemento de par de unión específico, de tal modo que se pueda identificar una señal detectable si la sustancia de interés está presente en el líquido. Es decir, en algunas realizaciones, el área en la que el elemento de par de unión específico se une a la membrana porosa puede exceder el área de contacto directo con el material poroso, pero se realizará una cantidad de contacto suficiente de manera que se pueda detectar la presencia del sustrato en el líquido.

Es preferible el contacto directo de la membrana y del material; sin embargo, se pueden interponer uno o varios materiales porosos intermedios, sustancialmente hidrófilos, entre el material poroso y la membrana porosa. En esta situación, los materiales porosos intermedios actúan de manera efectiva como materiales porosos secundarios, y por lo tanto, para los propósitos de la presente invención, se puede considerar que son un material poroso o una placa. Por lo tanto, la utilización de los términos material poroso o placa abarca múltiples materiales que proporcionan la misma, o esencialmente la misma función.

En algunas realizaciones, la puesta en contacto del material y la membrana comprende ejercer presión sobre la membrana y el material para asegurar un contacto completo, o esencialmente completo de los dos sobre, por lo menos, una parte del área en la que está situado el elemento de par de unión específico. Aunque no es necesario, se ha descubierto que, en ciertas circunstancias, la presión en este área puede mejorar el rendimiento del método. Por ejemplo, esta puede mejorar la sensibilidad y la fiabilidad del método. Puede mejorar asimismo las características de infiltración del material poroso, lo que puede aumentar la cantidad de muestra en el área de reacción. La presión pueda aumentar además la cantidad de contacto entre el material poroso y la membrana porosa. Es decir, en realizaciones en las que el material poroso comprende tanto una posición de aplicación de la muestra como una posición de reacción, se ha descubierto que la compresión del material poroso en la posición de reacción puede mejorar la sensibilidad del dispositivo, y por lo tanto el ensayo o el método de la invención. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular de funcionamiento, se cree que, además de mejorar el contacto entre la membrana y el material, la compresión del área de reacción del material poroso mejora la migración del líquido al área del material en contacto con la membrana, y en particular a la parte de la membrana que comprende el elemento de par de unión específico, e impide la migración de líquido fuera del área. En efecto, la compresión provoca que el líquido se reúna en el área de compresión. La migración mejorada hacia, pero no fuera del área provoca un aumento en la cantidad de sustancia en el área (en comparación con un material no comprimido) y mejora la difusión de la sustancia (si está presente) a la membrana porosa.

De acuerdo con el método que utiliza el dispositivo de la invención, el material poroso humedecido y la membrana porosa se mantienen en contacto durante una cantidad de tiempo suficiente para que la membrana porosa se humedezca, por lo menos, en una parte del área que comprende el elemento de par de unión específico. A hacerlo se permite que la sustancia, si está presente en la muestra, se difunda por, sobre, alrededor y/o en torno a la membrana y entre en contacto con el elemento de par de unión específico asociado con la membrana. Aunque la cantidad de tiempo proporcionado variará en función de la cantidad de sustancia en la muestra, de la porosidad del material poroso y de la membrana, de la cantidad de elemento de par de unión específico asociado con la membrana, de la especificidad y fortaleza de la unión del elemento de par de unión específico con la sustancia, de la temperatura y de otros factores (la totalidad de los cuales pueden ser seleccionados por los expertos en la materia sin experimentación innecesaria basándose en tiempos, concentraciones, temperaturas, etc., utilizadas generalmente en la técnica para las pruebas rápidas), habitualmente, la humectación suficiente de la membrana se debería producir dentro de un minuto. En realizaciones preferidas, la membrana y el material se mantienen en contacto durante por lo menos treinta segundos, tal como aproximada o precisamente treinta segundos, aproximada o precisamente un minuto, aproximada o precisamente 2 minutos, aproximada o precisamente 3 minutos, aproximada o precisamente 5 minutos, aproximada o precisamente 10 minutos, aproximada o precisamente 15

minutos, aproximada o precisamente 20 minutos, aproximada o precisamente 25 minutos, o aproximada o precisamente 30 minutos. Tal como se utilizan en la presente memoria, salvo que se indique lo contrario, los tiempos, las temperaturas y otros valores numéricos indicados incluyen un intervalo en torno al número indicado del 5 % a ambos lados del número indicado. Es decir, la indicación de "60 segundos" incluye cualquier cantidad de tiempo comprendida entre 57 segundos y 63 segundos.

El mantenimiento en contacto de la membrana y del material se puede llevar a cabo a cualquier temperatura. Sin embargo, es preferible utilizar temperaturas por debajo de 100 ° C, tales como la temperatura ambiente (20 ° C a 25 ° C), 30 ° C, 37 ° C, 40 ° C ó 50 ° C. De hecho, se ha descubierto de manera sorprendente que el presente método puede proporcionar sensibilidades mayores que las pruebas ELISA utilizando los mismos elementos de par de unión específico y sustancia, realizándose a temperatura ambiente en lugar de a 37 ° C (tal como se requiere para ELISA).

Análogamente, puede ser utilizada cualquier combinación o cantidad adecuada de elemento de par de unión específico y sustancia. En la técnica se conocen cantidades generales de diversos elementos de par de unión específicos a utilizar para la detección de contrapartes de la unión mediante su unión a una membrana. Por ejemplo, el elemento de par de unión específico puede estar presente en la membrana en una cantidad de aproximadamente 0,5 ng a aproximadamente 1000 ug, y sobre un área desde aproximadamente 0,5 mm cuadrados hasta aproximadamente 100 mm cuadrados o más. Las cantidades a unir a la membrana se pueden seleccionar en base a la cantidad de sustancia a detectar, a la cantidad/intensidad de la señal producida intrínsecamente por el marcador seleccionado y el sistema de generación de la señal, y al tamaño del área en la que se une el elemento de par de unión específico. Estos parámetros pueden ser seleccionados y ajustados por los expertos en la materia en base a características bien conocidas de cada sistema de generación de señal.

En algunas realizaciones, la aplicación de líquido se lleva a cabo antes de la puesta en contacto del material poroso con la membrana porosa. En otras realizaciones, la aplicación del líquido se lleva a cabo después de la puesta en contacto del material poroso con la membrana porosa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el material poroso y la membrana porosa están en contacto entre sí antes de que se aplique el líquido. En general, no es importante si el contacto entre el material poroso y la membrana porosa se produce antes o después de la aplicación de la muestra. El momento en el que se realiza el contacto se selecciona habitualmente junto con la configuración del dispositivo utilizado para un ensayo particular, y la facilidad de utilización del dispositivo.

El método comprende además detectar la presencia o ausencia de un complejo que comprende el elemento de par de unión específico y la sustancia de interés, donde la presencia de dicho complejo indica la presencia de la sustancia en el líquido. De acuerdo con la invención, si una muestra comprende una sustancia de interés, la difusión de la muestra entre el material poroso (es decir, la placa de reacción) y la membrana porosa permitirá que la sustancia entre en contacto con el elemento de par de unión específico, que está unido a la membrana. El método que utiliza el dispositivo de la invención detecta el complejo formado por el elemento de par de unión específico y la sustancia, mediante cualquiera de una serie de esquemas de detección aceptados en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo (diferente al elemento de par de unión específico unido a la membrana) que es específico para la sustancia puede ser expuesto la sustancia, ya sea antes de que la sustancia se exponga al elemento de par de unión específico (por ejemplo, antes de que se aplique la muestra al material poroso, mientras la muestra está migrando a través del material poroso, etc.) o después de que se haya proporcionado el tiempo suficiente para que entren en contacto la sustancia y el elemento de par de unión específico. En algunas situaciones, el anticuerpo estará marcado con una fracción detectable, tal como con un marcador que pueda ser detectado directamente (por ejemplo, una solución metálica, tal como oro coloidal; una solución colorante; una partícula coloreada, tal como látex); una microesfera paramagnética; y un compuesto fluorescente. Éste se puede marcar asimismo con un marcador indirecto, tal como una enzima que produzca una señal detectable cuando se expone a un sustrato (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina). En otras situaciones, el anticuerpo servirá como un elemento de par de unión específico para un marcador, tal como mediante la unión del marcador a la parte Fc del anticuerpo. Los marcadores pueden incluir asimismo pares de unión específicos en los que uno o ambos elementos contienen una fracción detectable, o una sustancia que puede generar una fracción detectable, tal como un par avidina (estreptavidina)/biotina o cualquiera de sus equivalentes funcionales.

Tal como se ha mencionado en el párrafo anterior, el marcador para la sustancia de interés se puede proporcionar como un componente del material poroso. Por ejemplo, se puede impregnar (como una sustancia seca o como una solución líquida a la que se permite secar en el material poroso) en la zona de reacción, la zona de aplicación de la muestra o la zona de migración de la muestra (situada entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de reacción, en ciertas realizaciones). Cuando la muestra líquida migra al material poroso y a través del mismo, el marcador se disuelve en el líquido y migra junto con el líquido a la posición de reacción y, finalmente, a la membrana. Durante el proceso de migración o durante el proceso de reacción, el marcador se une específicamente con la sustancia (si está presente), teniendo como resultado finalmente un complejo unido a la membrana, que comprende el elemento de par de unión específico, la sustancia de interés y el marcador. En realizaciones en las que el marcador está incluido en el material poroso, la selección del tamaño de poro del material dependerá, por lo menos en parte, de las características de migración del marcador o del complejo sustancia-marcador.

La detección de la sustancia puede proporcionar información cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa sobre la sustancia en la muestra. La detección cualitativa proporciona información que informa al facultativo de la presencia, pero no necesariamente de la cantidad, de la sustancia en la muestra. Sin embargo, colocando una cantidad conocida de elemento de par de unión específico en la membrana, conociendo la cantidad de sustancia que se puede unir al elemento de par de unión específico y conociendo la cantidad de complejo sustancia-marcador que tiene que estar presente para la detección, se puede proporcionar un método de detección de una sustancia que es semicuantitativo. Más específicamente, conociendo estas cantidades, y obteniendo una señal detectable, el facultativo sabrá que la sustancia no sólo está presente en la muestra, sino que la sustancia está presente, como mínimo, en una magnitud necesaria para producir la señal detectable. Si se desea, se puede obtener una medición cuantitativa de la cantidad de muestra comparando la intensidad de la señal de la muestra de prueba con una curva estándar de intensidades de señal obtenidas a partir de muestras que contienen cantidades conocidas de sustancia. En la técnica se conocen varias maneras de diseñar ensayos semicuantitativos y cuantitativos, y cualquiera que sea adecuada puede ser utilizada en esta invención.

La detección puede consistir asimismo en la ausencia de una señal detectable, o en la disminución de una señal que de lo contrario se generaría en ausencia de la sustancia o de alguna otra sustancia que sea indicativa de la presencia de la sustancia. Por lo tanto, los métodos de la invención abarcan todos los tipos de inmunoensayos (incluyendo tanto ensayos de tipo sándwich como ensayos competitivos) y cualesquiera otros ensayos que dependan de la detección, o de la no detección de la unión de, por lo menos, un elemento de par de unión específico con una sustancia de interés.

El método que utiliza el dispositivo de la invención puede comprender muchas otras etapas, que incluyen, de forma no limitativa, disponer una o varias reacciones de control para determinar si se han llevado a cabo satisfactoriamente una o varias etapas del método, determinar si uno o varios reactivos están funcionando según lo previsto o determinar si las sustancias que interfieren con la capacidad del método para generar resultados fiables están presentes en la muestra. Sustancias que pueden ser utilizadas como reactivos de control incluyen, de forma no limitativa, la sustancia a detectar o un análogo estructural, un anticuerpo que reacciona específicamente con otro anticuerpo, o cualquier otra cosa que se pueda unir específicamente a la sustancia de interés o a algún otro reactivo utilizado en el ensayo. Por consiguiente, el método que utiliza el dispositivo de la invención puede incluir añadir una sustancia conocida, que incluye la sustancia a detectar, para determinar si una o varias etapas del método están funcionando según lo previsto. Dichas reacciones de control son bien conocidas por los expertos en la materia, y no es necesario detallar su diseño e implementación en la presente memoria. Una reacción de control común comprende disponer una segunda área, ya sea en la membrana porosa que se une específicamente a la sustancia marcada o en una segunda membrana porosa, para mostrar no sólo que el marcador está presente y es funcional, sino para mostrar que el marcador ha tenido el tiempo suficiente para contactar con cualquier contraparte de unión asociada con la membrana. Por supuesto, se pueden disponer múltiples líneas en varias orientaciones, proporcionando cada una información repetitiva o diferente acerca de varios aspectos del método.

Además, el método que utiliza el dispositivo de la invención puede detectar una o varias sustancias en la muestra, además de la sustancia de interés principal. La otra sustancia o sustancias pueden ser otras sustancias que se produzcan naturalmente en la muestra a prueba, o pueden ser sustancias que se añadan intencionadamente a la muestra para servir como controles positivos, marcadores, competidores y similares. Por lo tanto, los métodos que utilizan el dispositivo de la invención pueden detectar dos o más sustancias en una muestra. Al hacerlo así, las múltiples sustancias se pueden detectar en la misma membrana porosa, o se pueden disponer múltiples membranas, ya sea en el mismo dispositivo o en dos dispositivos idénticos (con la excepción de la identidad de la sustancia o sustancias unidas a la membrana).

El método que utiliza el dispositivo de la invención puede comprender una o varias etapas de lavado. Aunque no se limita a ningún método en particular, se utiliza habitualmente lavado en realizaciones en las que se utilizan marcadores indirectos para detectar la sustancia. Por ejemplo, cuando se utiliza un marcador que usa un sustrato para generar una señal (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), el marcador estará presente habitualmente en la mezcla de reacción en exceso sobre la sustancia. Además, es posible que el complejo sustancia-marcador pueda estar presente en exceso sobre el elemento de par de unión específico unido a la membrana. En cualquiera de estas situaciones, si se permite que el exceso de marcador permanezca en la membrana que comprende el elemento de par de unión específico y en torno a la misma, reaccionará con el sustrato del marcador para producir una señal, que representaría una señal no específica o ruido de fondo. Para reducir este ruido de fondo, la membrana se puede lavar con un volumen apropiado de una solución de lavado apropiada. La solución de lavado se puede aplicar una o más veces, dependiendo de la cantidad utilizada y de la cantidad de marcador no unido presente. Análogamente, se pueden incluir otras etapas de lavado en otros puntos del método. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se utiliza para limpiar la membrana de conjugado no unido, con el fin de mejorar la sensibilidad de la detección. Los expertos en la materia son muy conscientes de las ventajas y desventajas de llevar a cabo o no etapas de lavado en varios puntos durante reacciones de unión específicas, y por lo tanto pueden seleccionar el tipo y la cantidad etapas de lavado, así como las soluciones de lavado a utilizar para cada realización particular de la invención. Dicha selección puede llevarse a cabo sin experimentación innecesaria.

La invención da a conocer un dispositivo para practicar el método descrito. El dispositivo de la invención permite que una muestra que contiene, o presuntamente contiene, una sustancia de interés sea retenida en un área o zona predefinida del dispositivo, donde el área o zona comprende una membrana porosa que comprende un elemento de par de unión específico que es específico, ya sea directa o indirectamente, para la sustancia.

La invención da a conocer un dispositivo según la reivindicación 1. El dispositivo puede comprender además un soporte para la membrana porosa. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende el recipiente y el soporte en contacto entre sí, haciendo el contacto entre los dos elementos que la membrana porosa y el material poroso estén en contacto directo entre sí sobre por lo menos una parte de la membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico.

El receptáculo es una unidad física y funcional del dispositivo. Éste proporciona un área y un volumen para líquidos que contienen, o se sospecha que contienen una sustancia de interés a retener. Éste proporciona asimismo un depósito para que el líquido se difunda entrando y saliendo de la membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico, que en la presente memoria se denomina una zona o placa de reacción. El receptáculo puede adoptar cualquier forma y tamaño, y fabricarse de cualquier material adecuado. El receptáculo comprende por lo menos un material poroso, denominado asimismo una placa en la presente memoria. Sin embargo, se debe observar que el material poroso no está necesariamente limitado en tamaño al área definida por el receptáculo. Es decir, un único material poroso o una combinación de materiales porosos pueden estar limitados en tamaño al área del receptáculo o se pueden extender más allá del área del receptáculo hasta el área de aplicación de la muestra y/o el área de lavado, o cualquier otra área presente en una configuración particular del dispositivo.

El material poroso (denominado asimismo "placa" en la presente memoria) se puede fabricar de cualquier material que tenga poros, aberturas o espacios a través de los cuales puedan pasar uno o varios líquidos. Por lo tanto, es cualquier material que sea absorbente. Ejemplos no limitativos de materiales porosos incluyen, de forma no limitativa, productos de papel, tales como papel absorbente o de filtración (por ejemplo papel de 3 mm Whatman®, y productos Filtrona®), materiales poliméricos sintéticos (por ejemplo, nitrocelulosa, nailon), plásticos y esferas de plástico (por ejemplo, microesferas de plástico Porex®; materiales utilizados en la fabricación de bolígrafos), tales como los fabricados de polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, etilvinilacetato, acronitrilo y politetrafluoretileno. Otros ejemplos no limitativos incluyen nanopartículas/esferas/tubos.

El tamaño de poro del material se puede seleccionar en base a las características deseadas. Están disponibles numerosas porosidades para los diversos tipos de materiales de los que se puede fabricar el material poroso. Por ejemplo, si una muestra a aplicar contiene particulados o sólidos (por ejemplo, heces, tierra), se puede elegir un tamaño de poro que excluya o reduzca significativamente la migración de estos materiales particulados o sólidos. Análogamente, si la muestra comprende sangre, se puede elegir un tamaño de poro que excluya o reduzca significativamente la migración de células de sangre y plaquetas. Alternativamente, si la muestra no contiene ninguna sustancia no deseable en la posición de detección (por ejemplo, una muestra que ha sido purificada previamente en alguna medida), el tamaño de poro del material se puede seleccionar independientemente de las características de la filtración. En general, el tamaño de poro variará desde aproximadamente 0,05 micrómetros hasta aproximadamente 0,5 micrómetros.

El material poroso se puede fabricar de un único material o puede comprender múltiples materiales porosos diferentes. Los diferentes materiales individuales se pueden configurar en cualquier configuración adecuada, tal como superponiendo unos sobre otros, poniendo en contacto los dos materiales extremo a extremo, o cualquier otra configuración que permita que un líquido fluya de un área del material a otra, tal como desde la posición de aplicación de un líquido hasta la posición de detección de la membrana porosa, cuando está en contacto con el material poroso. Por ejemplo, el material poroso puede comprender un tamaño de poro y un material de un tipo en la posición de aplicación del líquido (la zona de aplicación), un segundo tamaño de poro y/o material en la posición de detección (la zona de detección) y un tercer tamaño de poro y/o material (que puede ser el mismo que el primero) en una tercera área distal (con respecto a la posición de aplicación del líquido) a la posición de detección, funcionando la tercera posición como una posición de recepción de la solución de lavado (la zona de recepción de lavado). Los tamaños de poro y los materiales, y las combinaciones de los mismos, se pueden seleccionar para adecuarse a necesidades individuales en base a las diversas características de la muestra, la sustancia a detectar, la configuración del dispositivo o cualquier otra consideración. El material poroso puede contener sustancias que se consideran útiles en la práctica de la invención incluyendo, de forma no limitativa, marcadores para la sustancia, carbón vegetal activado, resinas de intercambio iónico y agentes tensoactivos. Además, los materiales porosos pueden estar separados de cualesquiera otros materiales menos porosos, no porosos o impermeables, tales como membranas hidrófobas. Estas membranas pueden ser extraídas en algún momento durante la práctica de un método de la invención, para permitir el flujo de líquidos desde uno o varios materiales hacia uno o varios otros materiales. Por ejemplo, los dos materiales porosos pueden estar separados por un material no poroso acoplado a una lengüeta de tracción. Al tirar de la lengüeta se extraen los materiales no porosos y se permite el flujo de líquidos, tal como una solución de lavado, a un material poroso (por ejemplo, una placa de lavado).

La membrana porosa es una membrana fabricada de cualquier material adecuado que permite que fluyan a su través líquidos y sustancias suspendidas de tamaño predeterminado. Habitualmente, la membrana está fabricada de

materiales que se sabe en la técnica que son adecuados para la detección de sustancias de interés mediante la unión específica de una molécula unida a la membrana, a una sustancia. Los ejemplos incluyen membranas de nailon, membranas de nitrocelulosa, membranas de polivinilpirrolidona, fibras de vidrio y similares.

La membrana porosa comprende por lo menos un elemento de par de unión específico. El elemento de par de unión específico está asociado con la membrana de tal modo que permanece asociado con la membrana en las condiciones de fabricación y utilización del dispositivo. Habitualmente, el elemento de par de unión específico está unido a la membrana mediante enlaces covalentes, iónicos o hidrófobos. La membrana se puede tratar antes de la unión para reforzar la unión. Análogamente, la membrana se puede tratar después de la unión para reforzar la unión o para reducir la unión de otras sustancias a lugares de la membrana diferentes a la posición en la que se une el elemento de par de unión específico. El elemento de par de unión específico se puede unir a la membrana utilizando cualquier técnica conocida. Además, se puede unir a la membrana en cualquier forma, diseño, patrón, dirección, etc., deseado (por ejemplo una línea, una cruz, un punto, un círculo) y en cualquier tamaño deseado (por ejemplo, un punto de 0,1 mm, 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, etc., de diámetro; una línea de 1 mm de grosor y 5 mm de longitud, de 2 mm de grosor y 1 cm de longitud, etc.). En realizaciones preferidas, la forma de detección ventajosa y conveniente se proporciona en forma de línea. En algunas realizaciones, la membrana porosa comprende dos o más áreas diferentes que contienen un elemento de par de unión específico. En ciertas realizaciones, dos o más áreas comprenden el mismo elemento de par de unión específico. En otras realizaciones, cada área comprende un elemento de par de unión específico diferente. Los elementos de par de unión específicos diferentes pueden ser específicos para la misma sustancia (para proporcionar un control interno de reproducibilidad), o pueden ser específicos para sustancias diferentes (por ejemplo, uno es específico para una sustancia de interés, mientras que otro u otros son específicos para otras sustancias de interés o para reactivos utilizados en el método de la invención).

Por lo tanto, la membrana porosa puede comprender otros componentes además del elemento de par de unión específico. Por ejemplo, puede comprender una molécula a utilizar como un control para el comportamiento del método de la invención, tal como un anticuerpo que se una específicamente al marcador utilizado para detectar la sustancia de interés en la muestra. Puede comprender asimismo un segundo elemento de par de unión específico, siendo específico el segundo elemento de par de unión específico para una segunda sustancia de interés en la muestra (que incluye una sustancia que se añade intencionadamente a la muestra para servir como control positivo). El elemento de par de unión específico puede ser un antígeno o un anticuerpo en un par de unión, un receptor o un ligando en un par de unión, o ambos componentes de un par de unión.

En algunas realizaciones, la membrana porosa está en contacto con un soporte. El soporte puede mantener la membrana en posición de tal modo que la membrana permanezca en contacto con la placa de reacción sobre por lo menos una parte de la membrana. Puede mantener asimismo la membrana en una posición de tal modo que se pueda poner en contacto con la placa de reacción, si se desea. Por ejemplo, el soporte puede ser un anillo, un cuadrado, etc., de plástico que contacta con la membrana. El contacto puede retener la membrana en el soporte, o simplemente retener la membrana en contacto con la placa de reacción. El soporte puede ser un componente físico independiente del dispositivo o puede estar fabricado como una parte integral del dispositivo, por ejemplo como una parte integral del recipiente del dispositivo.

El receptáculo está situado en el interior de un recipiente. El recipiente puede estar fabricado de cualquier material adecuado, pero habitualmente está fabricado de plástico. El recipiente proporciona al dispositivo de la invención una resistencia estructural considerable y una impermeabilidad a los líquidos considerable, y puede proporcionar asimismo otras funciones. En una configuración básica del dispositivo de la invención, el recipiente contiene la placa de reacción, y comprende la membrana. La membrana puede estar dispuesta de cualquier forma adecuada que permita el contacto de la membrana con la placa de reacción. Por ejemplo, la membrana puede estar unida a un soporte que está conectado al recipiente por medio de una articulación. Alternativamente, la membrana puede estar unida a un soporte que es integral con el recipiente, donde el recipiente está fabricado de dos mitades que encajan juntas de manera que la membrana contacta con la placa de reacción. Otras configuraciones adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia, y la totalidad de dichas configuraciones están abarcadas por la invención.

El dispositivo de la invención comprende además un área o zona de aplicación de muestras (denominada asimismo en la presente memoria la placa de aplicación de muestras) que comprende un material poroso. Tal como se ha descrito anteriormente, la muestra se puede aplicar al receptáculo o a la placa de reacción. Sin embargo, en algunas realizaciones, la muestra se añade a una posición distante del receptáculo y de la placa de reacción. En dichas realizaciones, la muestra se añade a la placa de aplicación de la muestra, que comprende un material poroso. El material poroso de la placa de aplicación de la muestra puede ser el mismo material que se utiliza en la placa de reacción (es decir, puede ser físicamente el mismo elemento o pueden ser dos elementos independientes fabricados del mismo material). Alternativamente, puede ser un material diferente, en el que los dos materiales se ponen en contacto entre sí de tal modo que el líquido procedente de la placa de aplicación puede pasar a la placa de reacción.

El tamaño de la zona de aplicación de muestras no es crítico. Sin embargo, es preferible que la zona de aplicación de muestras y la zona de reacción tengan conjuntamente la suficiente capacidad absorbente para absorber toda la muestra que está siendo aplicada. Además, la zona de aplicación de muestras puede comprender un área abierta

que no contenga la placa de aplicación, estando definida habitualmente el área mediante el borde de la placa de aplicación y el lateral del recipiente. Este área abierta puede estar diseñada para aceptar, ya sea directamente o por desbordamiento, la muestra que se está añadiendo, y puede servir para ayudar a filtrar y retener sólidos y partículas grandes presentes en la muestra.

El dispositivo comprende además una zona o área de recepción de la solución de lavado (denominada asimismo en la presente memoria una placa de recepción de la solución de lavado) que comprende un material poroso. El material poroso de la placa de recepción de la solución de lavado puede ser el mismo material que se utiliza en la placa de reacción y/o en la placa de aplicación de la muestra (es decir, puede ser físicamente el mismo elemento que las placas de reacción y aplicación de la muestra, o puede ser un elemento independiente fabricado del mismo material que una o ambas de las otras placas). Alternativamente, puede ser un material que sea diferente a una o ambas de la placa de reacción y la placa de aplicación de la muestra. En esta situación, la placa de recepción de la solución de lavado se pone en contacto con la placa de reacción, la placa de aplicación, o ambas, de tal modo que el líquido de lavado procedente de la membrana (que fluye a través de la placa de reacción) puede pasar a la placa de líquido de lavado.

En algunas realizaciones, está interpuesta una barrera impermeable o semipermeable al líquido, extraíble, entre la placa de recepción de la solución de lavado y una o varias de las otras placas del dispositivo. La barrera está presente en realizaciones para garantizar que no entra líquido de la placa de reacción o la placa de aplicación a la placa de recepción de la solución de lavado hasta que se añade la solución de lavado al dispositivo. Si bien habitualmente no es necesaria debido a las características del flujo de líquido y de la retención de la placa de reacción, la barrera se puede incluir en el dispositivo para mayor seguridad, para aumentar la cantidad de líquido presente en la placa de reacción o por cualquier otra razón. En otras realizaciones, pueden estar incluidas una o varias barreras impermeables al líquido entre una o varias de las diversas placas presentes en el dispositivo.

El dispositivo puede comprender una zona o placa de filtración entre la zona o placa de aplicación de la muestra y la zona o placa de reacción. Si bien la placa de aplicación de la muestra y la placa de reacción pueden proporcionar una filtración adecuada de la muestra, en ocasiones es deseable tener una filtración adicional de la muestra antes de la exposición de la muestra la membrana. En estas situaciones, se puede disponer una placa de filtración. En algunas realizaciones, la placa de filtración es simplemente una extensión de la placa de reacción más allá del área cubierta por la membrana. Alternativamente, puede ser simplemente una extensión de la placa de aplicación de la muestra que se extiende más allá del área en la que se aplica la muestra. En algunas realizaciones, la placa de aplicación de la muestra, la placa de filtración y la placa de reacción son el mismo elemento, estando diseñadas las diversas "placas" (o denominadas "zonas") en base a su función y posición en el interior del dispositivo y no a otras características físicas. La función principal de la placa de filtración es bloquear o retardar la migración de ciertas sustancias a la placa de reacción. Dicha filtración puede beneficiar la detección de la sustancia de interés retardando compuestos coloreados, retardando partículas grandes que podrían provocar ruido de fondo y similares.

Tal como se puede ver por la descripción anterior, la placa de reacción, la placa de aplicación de la muestra y la placa de filtración pueden estar fabricadas todas ellas de un material poroso (ya sea del mismo material o de materiales diferentes). Análogamente, la placa de recepción de la solución de lavado puede estar fabricada de un material poroso. El material poroso sirve para diversas funciones, pero en general puede servir para extraer líquido a través del material, de tal modo que éste pasa a otro material. Por ejemplo, las placas de aplicación de la muestra, de filtración y de reacción permiten que el líquido se desplace desde la posición de aplicación hasta la posición de detección (es decir, la membrana), mientras filtran simultáneamente diversos sólidos y partículas, materiales coloreados u otras sustancias. La placa de recepción de la solución de lavado puede extraer líquido de la placa de reacción cuando se añade solución de lavado a la membrana, permitiendo por lo tanto que la solución de lavado se lleve sustancias no deseadas que pueden interferir con la detección específica de la sustancia en la membrana.

El material poroso sirve para diversas funciones dentro de cada área o zona, y estas funciones coinciden significativamente con las funciones que pueden ser proporcionadas en otras áreas del dispositivo que comprende un material poroso. Para facilitar la descripción, muchas de las funciones se han descrito con respecto a cada área particular del dispositivo; sin embargo, no se deberá considerar que las características están limitadas solamente a las áreas para las que se han descrito dichas características. La posición física particular del material poroso en diferentes realizaciones será evidente para los expertos en la materia, y las funciones particulares del material poroso en cada área serán igualmente evidentes. No se debería considerar que las características se limitan a dicha área. Por ejemplo, en la zona del receptáculo, las funciones principales del material poroso son proporcionar un área o un volumen para líquidos que contienen, o se sospecha que contienen una sustancia de interés a retener, proporcionar un depósito para difundir líquido hacia y desde la membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico, y extraer líquido al área de reacción. Por lo tanto, el material poroso en esta zona se denomina en ocasiones la "placa de reacción" en la presente memoria. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la placa de reacción es asimismo el área de recepción de la muestra, y por lo tanto sirve también para recibir, y habitualmente filtrar la muestra. Además, debido a la colocación de la membrana en contacto con la placa de reacción, la placa de reacción sirve como el receptor inicial para la solución de lavado en realizaciones en las que se lava la membrana. Por consiguiente, la placa de reacción sirve asimismo como una placa de recepción de la solución de lavado inicial.

Por supuesto, se pueden incluir otros elementos en el dispositivo de la invención para proporcionar diversas ventajas. Se debe entender que la totalidad de dichos elementos adicionales están abarcados por la presente invención. Además, se pueden incluir etapas de método adicionales que proporcionan ventajas adicionales, y están abarcadas por la invención. Los expertos en la materia pueden incluir dichos elementos y etapas de métodos sin experimentación innecesaria y sin apartarse del alcance completo y el espíritu de la invención.

En algunas realizaciones, el dispositivo se dispone en un kit. El kit puede comprender solamente el dispositivo, en una o varias copias del mismo o en múltiples configuraciones diferentes. Alternativamente, el kit puede comprender otros materiales, tales como parte o la totalidad de los materiales, reactivos y equipo necesarios para practicar por lo menos una realización del método de la invención.

Los propios kits se pueden fabricar de cualquier material adecuado, tal como cartón, plástico, metal o vidrio. El cartón y plástico son los materiales preferibles para los kits. Los kits están fabricados para contener adecuadamente la totalidad de los componentes proporcionados por el kit. Por lo tanto, están diseñados para ser del tamaño, de la forma y de la resistencia adecuadas para contener los diversos componentes seleccionados a proporcionar por el kit.

Los componentes proporcionados por los kits pueden estar en uno o varios recipientes. Los recipientes del dispositivo de la invención se han descrito anteriormente, y pueden estar fabricados de cualquier material adecuado, incluyendo cualquiera de los diversos materiales plásticos cuya utilidad es conocida en la fabricación de dispositivos de esta naturaleza. Los recipientes para otros componentes pueden estar fabricados de cualquier material adecuado incluyendo, de forma no imitativa, plástico (por ejemplo, un material polimérico), vidrio, metal y caucho. Los recipientes pueden tener cualquier perfil o forma, y por lo tanto pueden ser, por ejemplo, botellas, viales, botes, jarras o bolsas, tal como las fabricadas de metal, plástico, caucho, vidrio o tejido. Los recipientes son preferentemente recerrables o de cierre automático para conservar después de la apertura inicial el contenido no utilizado.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los kits comprenden uno o varios dispositivos (por ejemplo, 10, 20, 25, 30, 50, 100) y por lo menos un recipiente que contiene un componente que es útil para practicar por lo menos una realización de la invención. Por ejemplo, un kit puede comprender 25 dispositivos, cerrados independientemente, o dos o más juntos, en bolsas recerrables. Opcionalmente, las bolsas pueden contener un desecante para mantener un contenido bajo de humedad durante el almacenamiento. El kit puede comprender asimismo uno o varios de los componentes siguientes, en cualquier recipiente o recipientes y cantidades/volúmenes adecuados: un diluyente (preferentemente acuoso) para diluir una muestra original; tampón de lavado (preferentemente acuoso); un elemento de par de unión específico (por ejemplo, un conjugado para la unión a la sustancia de interés en la muestra, y al que se puede unir un anticuerpo incluido en la membrana porosa del dispositivo); un sustrato (por ejemplo, un sustrato para una reacción enzimática o para producir de otro modo una señal detectable); un control positivo (por ejemplo, un antígeno de identidad conocida que se une, con una afinidad conocida, con un anticuerpo que está incluido en una membrana porosa del dispositivo); una pipeta (por ejemplo, pipetas desechables para añadir uno o varios reactivos, etc., a la muestra o al dispositivo); un tubo de ensayo, guantes, una varilla de aplicación, puntas de pipeta. Los expertos en la materia pueden concebir otros componentes funcionales de los kits, y la totalidad de dichos componentes están abarcados por la presente invención.

Preferentemente, por lo menos parte de los dispositivos se esterilizan antes, durante o después de su introducción en los kits. Preferentemente uno, algunos o la totalidad de los componentes se esterilizan antes, durante o después de su introducción en el kit. En realizaciones muy preferidas, cada componente en el kit es estéril o ha sido esterilizado, ya sea independientemente de uno o varios de los otros componentes, o conjuntamente en el kit. La esterilización se puede conseguir por cualquier medio conocido que incluye, de forma no imitativa, filtración de líquidos, irradiación mediante radiación electromagnética (por ejemplo, irradiación UV, gamma), esterilización química (por ejemplo, limpieza con un desinfectante tal como alcohol) y similares.

Las instrucciones para la utilización de uno o varios componentes del kit, o para practicar los métodos de la invención, pueden estar incluidas en el kit. Las instrucciones se pueden proporcionar como un componente independiente, tal como material impreso en un papel, una tarjeta, una hoja de plástico o similares. Alternativamente, las instrucciones se pueden proporcionar en el propio kit, por ejemplo, en un lado o en la parte superior o inferior del kit. Alternativamente, las instrucciones se pueden proporcionar en un recipiente para un componente del kit.

Pasando ahora a las figuras, que representan varias realizaciones específicas no limitativas de la invención, los elementos descritos anteriormente se describen en diversas relaciones espaciales mutuas y se describe la utilización de diversas configuraciones del dispositivo de la invención para llevar a cabo el método. Se debe entender que cualesquiera dimensiones proporcionadas en las figuras se proporcionan solamente como ejemplos, y que los tamaños y las formas reales del dispositivo no están limitados a los proporcionados en las figuras. Por ejemplo, los tamaños pueden ser mayores o menores que los ejemplificados en las figuras, en un orden de magnitud o más. Además, se debe entender que las figuras no representan necesariamente todos los elementos a escala real entre sí, estando algunos exagerados con propósitos de claridad o por otras razones.

La figura 1 representa, en general, una configuración básica de un dispositivo 1 que no cae dentro del alcance de la reivindicación 1. El dispositivo representado en la figura 1 comprende un receptáculo 100 que comprende un material poroso en la forma de una placa 110 (denominada asimismo en la presente memoria la "placa de la cámara de reacción"). El dispositivo comprende además una membrana porosa 120 que comprende un elemento de par de unión específico 130 para una sustancia de interés que está acoplada, mediante enlace covalente, hidrófobo o de enlace iónico, a lo largo de una línea única en el centro de una membrana. Cuando se utiliza esta configuración del dispositivo, una muestra de líquido que contiene, o presuntamente contiene una sustancia de interés se aplica al receptáculo 100 en cualquier área. A continuación, la membrana porosa 120 se pone en contacto directo con el material poroso 110 del receptáculo 100 de tal modo que la membrana 120 y el material 110 forman una superficie de contacto continua sobre por lo menos el área de la membrana 110 donde está situado el elemento de par de unión específico 130. A continuación, se permite que el líquido presente en el material poroso 110 se difunda entrando, saliendo, atravesando y rodeando la membrana 120, permitiendo que la sustancia, si está presente, entre en contacto con el elemento de par de unión específico 130 y pase a unirse específicamente a éste. En realizaciones en las que la sustancia ya se ha marcado, la detección de la unión se puede conseguir en este momento. En realizaciones en las que todavía no se ha asociado el marcador con la sustancia, el complejo elemento de par de unión específico-sustancia se puede marcar y a continuación detectar. En algunas realizaciones, se incluye una etapa de lavado para reducir el fondo. Cuando se lleva a cabo una etapa de lavado, se aplica la solución de lavado a la membrana 120 y se permite que empape el material poroso 110, eliminando de ese modo materiales que no se unen a la membrana 120 y mejorando la relación señal/ruido. En algunas realizaciones, la sustancia en la muestra se une primero mediante un elemento de unión específico que se une específicamente a uno asociado con la membrana (por ejemplo, un conjugado), y se da tiempo para que reaccionen los dos elementos de par de unión específicos.

El dispositivo 1 de la figura 1 se denomina asimismo en varios lugares a continuación una "cámara de reacción" cuando se utiliza junto con los otros elementos.

Con respecto a la figura 2, se representa un dispositivo 2 que comprende un receptáculo 200 que comprende un material poroso 210. En esta realización, la membrana porosa 220 está en contacto con el material poroso 210 de tal modo que existe un contacto continuo entre la membrana porosa 220 y el material poroso 210 en el área del elemento de par de unión específico 230. En la práctica del método con esta configuración del dispositivo, se aplica una muestra líquida que contiene, o se sospecha que contiene una sustancia de interés al receptáculo en cualquier área diferente al área en contacto con la membrana porosa 220. Se permite que el líquido presente en el material poroso se difunda entrando, saliendo, atravesando y rodeando la membrana 220, permitiendo que la sustancia, si está presente, entre en contacto con el elemento de par de unión específico 230 y pase a unirse específicamente a éste. En realizaciones en las que la sustancia ya se ha marcado, la detección de la unión se puede conseguir en este momento. En realizaciones en las que todavía no se ha asociado el marcador con la sustancia, el complejo elemento de par de unión específico-sustancia se puede marcar y a continuación detectar. En algunas realizaciones, se incluye una etapa de lavado para reducir el fondo. Cuando se lleva a cabo un lavado, se aplica la solución de lavado a la membrana 220 y se permite que empape el material poroso 210, eliminando de ese modo materiales que no se unen a la membrana 220 y mejorando la relación señal/ruido.

La figura 3 representa otra realización del dispositivo 3, en la que el receptáculo 300 que comprende material poroso 310 está contenido en el recipiente 335, y en la que una membrana porosa 320 es soportada por el soporte 336. En esta realización, el soporte 336 y el recipiente 335 están fabricados de plástico. El soporte 336 es integral con el recipiente 335, estando los dos conectados mediante una parte relativamente flexible del plástico en la articulación 338. En otras realizaciones, se utilizan otros materiales y/u otras estructuras incluyendo, de forma no limitativa, para proporcionar la función de articulación.

En la práctica del método con esta configuración del dispositivo, se aplica una muestra líquida que contiene, o se sospecha que contiene una sustancia de interés al receptáculo 300 en cualquier área del material poroso 310, ya sea directamente o por medio del espacio presente entre el receptáculo 300 y el recipiente 335, tal como en el área 331. A continuación el soporte 336 que comprende la membrana 320 se balancea hacia abajo por medio de la articulación 338, de tal modo que la membrana 320 está en contacto con el material poroso 310, por lo menos en una parte de la membrana 320 en la que está presente el elemento de par de unión específico (no representado). Una sujeción o borde 337 acopla el soporte 336 para mantener la membrana 320 en contacto con el material 310, tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, se permite que el líquido presente en el material poroso 310 se difunda entrando y saliendo de la membrana 320, permitiendo que la sustancia, si está presente, contacte con el elemento de par de unión específico (no representado) presente en la membrana 320 y pase a unirse específicamente a la misma. En realizaciones en las que la sustancia ya se ha marcado, la detección de la unión se puede conseguir en este momento. En realizaciones en las que todavía no se ha asociado el marcador con la sustancia, el complejo elemento de par de unión específico-sustancia se puede marcar y a continuación detectar. En algunas realizaciones, se incluye una etapa de lavado para reducir el fondo. Cuando se lleva a cabo un lavado, se aplica la solución de lavado a la membrana 320 y se permite que empape el material poroso 310, eliminando de ese modo materiales que no se unen a la membrana 320 y mejorando la relación señal/ruido.

La figura 4A representa un dispositivo 4, donde el dispositivo 3 de la figura 3 está modificado para incluir una placa de recepción de la solución de lavado 440 situada en contacto con el material poroso 410. La placa de recepción de la solución de lavado 440 está fabricada de un material poroso que puede ser el mismo de la placa de reacción 410 u otro diferente. En esta realización, la placa de recepción de la solución de lavado 440 es una placa independiente respecto de la placa de reacción 410; sin embargo, en otras realizaciones la placa de reacción 410 y la placa de recepción de la solución de lavado 440 son el mismo elemento, basándose la diferenciación principalmente en la función.

Más específicamente, el receptáculo 400 que comprende la placa de reacción 410 está contenido en el recipiente 435, que contiene no sólo el receptáculo 400 sino asimismo la placa de recepción de la solución de lavado 440. La membrana porosa 420 es mantenida por el soporte 436. En esta realización, el soporte 436 y el recipiente 435 están fabricados de plástico, y el soporte 436 es integral con el recipiente 435, estando los dos conectados mediante una parte relativamente flexible del plástico en la articulación 438. En otras realizaciones, se utilizan otros materiales y/o estructuras, para proporcionar la función de articulación.

En la práctica del método con esta configuración del dispositivo, se aplica una muestra líquida que contiene, o se sospecha que contiene una sustancia de interés al receptáculo 400 en cualquier área de la placa de reacción 410, ya sea directamente o por medio del espacio presente entre el receptáculo 400 y el recipiente 435, tal como en el área 431. A continuación el soporte 436 que comprende la membrana 420 se balancea hacia abajo por medio de la articulación 438, de tal modo que la membrana 420 está en contacto con la placa de reacción 410, por lo menos en una parte de la membrana 420 en la que está presente el elemento de par de unión específico (no representado). Una sujeción o borde 437 acopla con el soporte 436 para mantener la membrana 420 en contacto con la placa de reacción 410, tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, se permite que el líquido presente en la placa de reacción 410 se difunda entrando y saliendo de la membrana 420, permitiendo que la sustancia, si está presente, contacte con el elemento de par de unión específico (no representado) presente en la membrana 420 y pase a unirse específicamente a la misma. En realizaciones en las que la sustancia ya se ha marcado, la detección de la unión se puede conseguir en este momento. En realizaciones en las que todavía no se ha asociado el marcador con la sustancia, el complejo elemento de par de unión específico-sustancia se puede marcar y a continuación detectar.

En algunas realizaciones, se incluye una etapa de lavado para reducir el fondo. Cuando se lleva a cabo un lavado, se aplica la solución de lavado a la membrana 420 y se permite que empape la placa de reacción 410, eliminando de ese modo materiales que no se unen a la membrana 420 y mejorando la relación señal/ruido. Habitualmente, la cantidad de solución de lavado aplicada a la membrana 420 excede la capacidad de contención de la placa 410, que ha sido ya humedecida (por lo menos parcialmente) con el líquido que contiene la sustancia de interés. En esta situación, el exceso de solución de lavado (y alguna muestra líquida original) se desplaza a través de la placa de reacción 410 a la placa de recepción de la solución de lavado 440.

La figura 4B representa una configuración alternativa del dispositivo 4 representado en la figura 4A, en el que la placa de recepción de la solución de lavado 440 está situada por debajo de la placa de reacción 410. El principio de funcionamiento del dispositivo es el mismo que se ha descrito con respecto a la figura 4A. Sin embargo, en esta configuración, no es preferible que el líquido se aplique en el espacio entre la placa de reacción 410 y el recipiente 435. En esta figura, todos los elementos tienen la misma identidad que los de la figura 4A.

La figura 4C representa una configuración alternativa del dispositivo representado en la figura 4A, en la que la placa de recepción de la solución de lavado 440 y la placa de reacción 410 están separadas mediante una barrera extraíble 445 impermeable al líquido. En esta configuración, la barrera impermeable 445 se interpone entre la placa de recepción de la solución de lavado 440 y la placa de reacción 410, y se extiende al exterior del recipiente 435 a través de la ranura 446 para dejar al descubierto la lengüeta 447. La práctica de este método con esta configuración es similar a lo descrito anteriormente con respecto a la figura 4A. Sin embargo, debido a que la barrera impermeable 445 bloquea la migración de líquidos hacia la placa de recepción de la solución de lavado 440, la barrera impermeable 445 se extrae habitualmente después del contacto de la membrana 420 y la placa de reacción 410, y antes de la aplicación de la solución de lavado a la membrana 420. Esta forma de utilización limita asimismo el flujo de la muestra original desde la aplicación/placa de reacción 410 a la placa de recepción de la solución de lavado 440 hasta después de que se haya producido durante una cantidad de tiempo deseada la difusión de la muestra entrando y saliendo de la membrana 420. Todos los demás elementos representados en este panel son iguales a los descritos en relación con la figura 4A.

En otra configuración del dispositivo, representada en la figura 5, el diseño básico representado en la figura 1 se modifica para producir un dispositivo 5, de manera que el material poroso 510 del receptáculo 500 se extiende más allá de la cámara de reacción (es decir, es más largo que el área de la membrana porosa 520) para proporcionar una zona 550 de aplicación de la muestra líquida que comprende una placa de aplicación de la muestra 551. En la realización representada, la placa de aplicación de la muestra 551 y la placa de reacción 510 son la misma. Sin embargo, en otras realizaciones, estos dos elementos son independientes, y están dispuestos de tal modo que están en contacto físico entre sí de manera que puede fluir líquido de uno a otro. En la práctica de la invención con esta configuración del método, una muestra líquida que contiene, o se sospecha que contiene una sustancia de interés se aplica a la placa de aplicación de la muestra 551 en cualquier área en el interior de la zona 550 de aplicación de

la muestra. Debido a su naturaleza porosa, la placa de aplicación de la muestra 551 hace que por lo menos una parte de la muestra aplicada migre a la placa de reacción 510, de donde puede migrar a continuación, por difusión pasiva, entrando y saliendo de la membrana porosa 520, y permite que la sustancia de interés, si está presente, contacte, y se una con el elemento de par de unión específico (no representado) en la membrana porosa 520. Si se desea, se puede llevar a cabo la detección y el lavado tal como se ha descrito anteriormente.

La figura 6 representa un dispositivo 6, que es una configuración del dispositivo representado en la figura 5, pero modificado para incluir un recipiente 635 para la placa de aplicación de la muestra 651 y la placa de reacción 610, y para incluir un soporte 636 para la membrana porosa 620. En esta realización particular, el recipiente 635 comprende una abertura o un orificio 655 que permite la aplicación de la muestra líquida a la placa de aplicación 651. La utilización de esta realización del dispositivo puede proceder tal como se ha explicado anteriormente.

La figura 7 representa el dispositivo 7, que es una configuración del dispositivo representado en la figura 6, en el que está dispuesta una placa de recepción de la solución de lavado 740 junto a la placa de reacción 710 y en contacto con la misma. En la práctica del método con esta configuración del dispositivo, después de la aplicación de la muestra a la placa de aplicación de la muestra 751, de la migración de líquido a la placa de reacción 710 y de la difusión del líquido entrando y saliendo de la membrana porosa 720, se añade una solución de lavado a la membrana 720 y el exceso de solución de lavado (junto con una parte de la muestra líquida original) fluye a través de la placa de reacción 710 hacia la placa de recepción de la solución de lavado 740. Todos los elementos representados en esta figura, aparte de los mencionados específicamente, son iguales que los de la figura 6 y/o la figura 5, donde los elementos similares representados son el mismo elemento en una y otra figura.

La figura 8 representa un dispositivo 8, que es una configuración del dispositivo en la que la placa de reacción 810 está fabricada del mismo material que la placa de aplicación de muestras líquidas 851 y la placa de recepción de la solución de lavado 840, pero está comprimida, comparada con la placa de aplicación de muestras 851 y la placa de recepción de la solución de lavado 840, mediante presión ejercida por el soporte 836. En esta realización, la presión se ejerce sobre la membrana 820, lo que provoca la compresión de la placa de reacción 810. Esta compresión mejora la retención de la muestra en la placa de reacción 810, y fomenta la difusión de la muestra entre la placa de reacción 810 y la membrana 820. Todos los elementos representados en esta figura, aparte de los mencionados específicamente, son iguales que los de la figura 7, la figura 6 y/o la figura 5, donde los elementos similares representados son el mismo elemento en cada figura.

La figura 9 representa el dispositivo 9, que es una configuración del dispositivo de la invención, en la que la placa de reacción 910 está fabricada del mismo material que la placa de aplicación de la muestra líquida 951 y la placa de recepción de la solución de lavado 940, pero se comprime, en comparación con la placa de aplicación de la muestra 951 y la placa de recepción de la solución de lavado 940, mediante presión ejercida desde debajo (con respecto a la membrana porosa 920) por el recipiente 935. En la figura, la compresión es producida por el recipiente 935, que está moldeado en una forma que proporciona este efecto. Sin embargo, en otras realizaciones equivalentes, el recipiente 935 comprende un elemento adicional que proporciona la presión en la placa de reacción 910. La presión ejercida por el recipiente 935 proporciona los mismos beneficios descritos anteriormente con respecto a la figura 8 y tal como se ha explicado en otros lugares de la descripción. Todos los elementos representados en esta figura diferentes a los mencionados específicamente son iguales que los de la figura 8, la figura 7, la figura 6 y/o la figura 5, donde los elementos similares están representados y/o numerados de igual manera en cada figura.

La figura 10 muestra una configuración del dispositivo 10 de la invención, mirando al exterior del dispositivo 10 desde arriba. En esta figura, el orificio 1055 de aplicación de muestras está situado en un extremo del dispositivo 10, y una abertura en el dispositivo 10 sobre la membrana porosa 1020 proporciona una ventana de detección 1060 a cuyo través se puede observar la detección de la presencia de la sustancia de interés (y, opcionalmente, una o varias reacciones de control). El orificio 1055 y la ventana 1060 están situados en el recipiente 1035. En la práctica del método utilizando esta realización del dispositivo, se añade la muestra a una placa de aplicación o a una placa de reacción por debajo, o cerca del orificio 1055, ya sea directamente a la placa o a un espacio situado entre la placa y el recipiente 1035. La muestra, o parte de la misma, se desplaza a lo largo de la placa por lo menos hasta que entra en contacto con la membrana 1020, preferentemente a través de una placa de reacción (no representada) debajo de la membrana 1020. La difusión de la muestra entrando, saliendo, a través y sobre la membrana 1020 permite el contacto entre la sustancia de interés en la muestra y un elemento de par de unión específico (no representado) asociado con la membrana 1020. La detección de la sustancia unida al elemento de par de unión específico en la membrana se puede producir observando la membrana a través de la ventana 1060.

La figura 11 muestra una configuración alternativa del dispositivo 11 representado en la figura 10. En esta configuración, el orificio 1155 de aplicación de la muestra está situado en una esquina del dispositivo 11, y la ventana de detección 1160 y la membrana 1120 están situadas centralmente. En la práctica del método de la invención con esta realización del dispositivo, se añade una muestra a una placa de aplicación o a una placa de reacción (no representada) por debajo del orificio 1155 o cerca del mismo, ya sea directamente a la placa o a un espacio entre la placa y el recipiente 1135. La muestra, o una parte de la misma, se desplaza a lo largo de la placa, por lo menos, hasta que entra en contacto con la membrana 1120. La difusión de la muestra entrando, saliendo, a través y sobre la membrana 1120 permite el contacto entre la sustancia de interés en la muestra y un elemento de

par de unión específico asociado con la membrana 1120. La detección de la sustancia unida al elemento de par de unión específico en la membrana se puede producir observando la membrana a través de la ventana 1160.

La figura 12 muestra una vista superior de la configuración del dispositivo 12 de la invención, en la que la membrana porosa 1220 comprende un elemento de par de unión específico 1230, que es específico para el sustrato de interés, y un control positivo 1270. En esta configuración, ambos elementos están situados en la membrana 1220 de tal modo que están dentro del área definida por la ventana de detección 1260. Todos los elementos representados en la figura 12 que no se explican específicamente son iguales a los representados en la figura 11, y tienen todos la misma función. La práctica del método procede según la descripción anterior. La práctica del método utilizando esta realización del dispositivo permite probar en una única muestra una sustancia desconocida proporcionando al mismo tiempo un control positivo para el comportamiento del dispositivo y el método.

La figura 13 muestra una configuración de un dispositivo 13 de la invención, en el que una única placa de aplicación de la muestra 1351 en el interior del recipiente 1335 se bifurca para conectarse a dos placas de reacción independientes 1310a y 1310b, cada una de las cuales está, por lo menos parcialmente, por debajo de, y en contacto con una membrana porosa diferente 1320a y 1320b y una placa de recepción de la solución de lavado diferente 1340a y 1340b. Las membranas porosas 1320a y 1320b comprenden elementos de par de unión específicos 1330a y 1330b, cada uno de los cuales son específicos para una sustancia diferente. En esta configuración del dispositivo, el método puede ser utilizado para detectar dos sustancias diferentes en una única muestra líquida. En algunas realizaciones, se sabe que una de las sustancias está presente en la muestra (ya sea naturalmente o como componente añadido), y por lo menos una membrana (ya sea 1320a ó 1320b) actúa como un control positivo para el dispositivo y el método.

La figura 14A representa una configuración del dispositivo 14 de la presente invención, en la que la placa de aplicación de muestras 1451 se extiende más allá del área interior del dispositivo 14 definida por el recipiente 1435. La placa de aplicación 1451 de muestras es integral con la placa de filtración 1470, la placa de reacción 1410 y la placa de recepción de la solución de lavado 1440. La placa de aplicación 1410 está, por lo menos parcialmente por debajo, y en contacto directo con la membrana 1420, que comprende el elemento de par de unión específico 1430. En la práctica de la invención utilizando esta configuración del dispositivo de la invención, la placa de aplicación 1451 contacta con una muestra líquida por inmersión en el líquido, introducción en un flujo del líquido (por ejemplo, un flujo de orina), aplicación de la muestra a la placa mediante pipeteo, o similares. La muestra líquida pasa a través de la placa de aplicación 1451 a la placa de filtración 1470. En algunas realizaciones, un marcador (no representado) que se une a la sustancia de interés está presente en la placa de filtración 1470 y es solubilizado por el líquido. El marcador se une a la sustancia que está presente en la muestra durante su paso a través de la placa de filtración 1470 (y/o en un momento posterior durante el ensayo). La muestra líquida pasa a continuación a la placa de reacción 1410 y se difunde entrando, atravesando, saliendo de, y rodeando la membrana 1420. En algunas realizaciones, un marcador que se une a la sustancia de interés está presente en, y/o sobre la superficie de la placa de reacción 1410 y es solubilizado por el líquido. El marcador se une a la sustancia que está presente en la muestra durante su paso a través de la placa de reacción 1410 (y/o en un momento posterior durante el ensayo). La difusión desde la placa de reacción 1410 entrando, atravesando, saliendo de, y rodeando la membrana 1420 permite el contacto de la sustancia de interés (si está presente) o del complejo sustrato-marcador con el elemento de par de unión específico 1430. En realizaciones en las que se utiliza un marcador directo, éste se puede unir a la sustancia en un momento previo (tal como se acaba de describir) o se puede unir a la sustancia en el mismo momento, o después de la unión de la sustancia al elemento de par de unión específico. Con la formación de un complejo elemento de par de unión específico-sustancia-marcador, se detecta la presencia de la sustancia. En realizaciones en las que se utiliza un marcador indirecto, el marcador se puede añadir en cualquiera de los momentos descritos anteriormente. Con la formación de un complejo elemento de par de unión específico-sustancia-marcador, cualquier exceso del marcador y otras sustancias que puedan estar presentes en la membrana se puede lavar aplicando una solución de lavado a la membrana 1420. La solución de lavado pasa por la membrana 1420 y entra a la placa de reacción 1410. Debido a que existe un exceso de solución de lavado más allá de la capacidad de transporte de la placa de reacción 1410, el líquido es conducido a la placa de recepción de la solución de lavado 1440, a la placa de filtración 1470 o a ambas. Dado que la placa de recepción de la solución de lavado 1440 está habitualmente seca o sustancialmente seca (debido a la selección de la magnitud apropiada de volumen a añadir a la zona de aplicación 1451) mientras que la placa de filtración 1470 está por lo menos parcialmente húmeda, la placa de recepción de la solución de lavado 1440 absorbe habitualmente la mayoría de la solución de lavado aplicada a la membrana. El lavado se puede repetir tantas veces como sea necesario para conseguir una relación señal/ruido adecuada. Después del lavado, se puede añadir el sustrato para el marcador indirecto, y se puede llevar a cabo otro lavado, si se desea, para reducir la señal de fondo. La detección de una señal específica indica la presencia de la sustancia de interés en la muestra original.

La figura 14B representa otra realización del dispositivo 14 representado en la figura 14A. En el dispositivo de la figura 14B, la placa aplicadora 1451 comprende un material plástico absorbente sobre el que se aplica directamente una muestra, tal como orina, que comprende un conjugado de enzima que se une a la sustancia de interés. La muestra más el conjugado de enzima se desplaza por la placa de filtración 1470, que es unitaria con la placa de aplicación 1451, y entra al recipiente 1435 a través de la placa de filtración 1470, que ha sido comprimida por el recipiente 1435. La muestra más el conjugado de enzima se desplaza a través de la placa de filtración 1470 a la

placa de reacción 1410, que es unitaria con la placa de filtración 1470 y es comprimida por el recipiente 1435, de manera similar a la placa de filtración 1470. Si está presente una sustancia de interés, esta reaccionará con el conjugado de enzima tras la mezcla antes de la aplicación, durante el paso a través de la placa de aplicación de la muestra 1451, la placa de filtración 1470 o la placa de reacción 1410. Se permite que la muestra contacte con la membrana 1420 durante una cantidad de tiempo suficiente para que la sustancia (o el complejo sustancia-conjugado marcador) se difunda entrando, saliendo y a través de la membrana 1420 y contacte con el elemento de par de unión específico 1430 (no mostrado) y forme un complejo. A continuación se aplica una solución de lavado a la membrana 1420 y el exceso de solución de lavado se desplaza por la membrana 1420 y entra, por lo menos, a la placa de recepción de la solución de lavado 1440. La detección de la presencia o ausencia de la sustancia en la muestra se produce detectando una señal producida por la membrana 1420 en, o cerca del elemento de par de unión específico 1430 (no mostrado).

La figura 14C muestra una configuración más del dispositivo 14 representado en las figuras 14A y 14B. En esta configuración, la placa de aplicación de la muestra 1451, la placa de filtración 1470, la placa de reacción 1410 o una combinación de dos o todas las anteriores comprende un conjugado de oro. El conjugado de oro, que se une específicamente a la sustancia de interés, se disuelve mediante la muestra líquida aplicada a medida que atraviesa las placas, y se une a la sustancia, si está presente. Tras el contacto del líquido (ahora filtrado) con la membrana 1420 mediante la difusión entrando, saliendo, atravesando y rodeando la membrana 1420, el conjugado sustancia-oro se une al elemento de par de unión específico 1430 (no mostrado), lo que tiene como resultado la generación de una señal detectable en, o cerca del elemento de par de unión específico 1430 dentro de aproximadamente 30 segundos o más de contacto del líquido con la membrana 1420. La presencia de la sustancia en el líquido se determina mediante la detección de una señal (habitualmente por simple observación) en la ventana de detección 1460 sin la necesidad de una etapa de lavado.

La figura 15 representa una configuración del dispositivo 15. Tal como se muestra en la figura 15A, el recipiente 1535 es un recipiente de tipo "concha de almeja" en el que una mitad superior 1535a y una mitad inferior 1535b están acopladas entre sí a lo largo de un borde mediante una articulación flexible 1580.

Aunque no se representa en la figura, en algunas realizaciones, un soporte para una membrana es integral con la mitad superior 1535a y define los bordes de una ventana de detección. Un orificio de carga de la muestra es integral asimismo con la mitad superior 1535a y está definido por una abertura en la mitad superior 1535a en una posición sobre una placa de aplicación. La mitad superior 1535a comprende asimismo una o varias espigas o rebajes para alojar espigas, donde el acoplamiento de las espigas con los rebajes provoca un ajuste por fricción que mantiene juntas la mitad superior 1535a y la mitad inferior 1535b.

En las realizaciones habituales, la mitad inferior 1535b contiene una placa de aplicación de la muestra, una placa de filtración, una placa de reacción y una placa de recepción de la solución de lavado. Comprende asimismo habitualmente uno o varios rebajes para alojar espigas, o una o varias espigas, donde el acoplamiento de los rebajes con las espigas provoca un ajuste por fricción que mantiene juntas la mitad superior 1535a y la mitad inferior 1535b.

La figura 15B representa una vista superior de la mitad inferior de una realización del dispositivo 15 representado en la figura 15A. En la figura, la placa de aplicación de la muestra 1551 es integral con la placa de filtración 1570, la placa de reacción 1510 y la placa de recepción de la solución de lavado 1540, todas las cuales tienen una anchura de 2,2 cm. La placa de reacción 1510 es 0,3 cm más ancha que la placa de aplicación de la muestra 1551, la placa de filtración 1570, la placa de reacción 1510 y la placa de recepción de la solución de lavado (0,15 cm a cada lado) para soportar completamente la membrana 1520 (no representada), que mide 0,75 cm de longitud por 2,5 cm de anchura. Están presentes rebajes 1581 para postes de alineamiento de ajuste por fricción, como parte del recipiente 1535b, así como postes 1582 de sujeción.

La figura 15C muestra una sección transversal desde el lateral del dispositivo 15 representado en la figura 15A y/o en la figura 15B, donde la mitad superior 1535a está situada sobre, pero no en contacto con la mitad inferior 1535b, y donde la articulación está retirada para permitir el alineamiento de las mitades superior e inferior con propósitos descriptivos. La figura indica la colocación del orificio 1555 de aplicación de la muestra, y la ventana de visualización o detección 1560.

La figura 15D es una sección transversal desde el lateral del dispositivo 15 representado en la figura 15A, 15B y/o 15C, en el que la mitad superior y la mitad inferior están unidas mediante ajuste por fricción. Tal como se puede ver por la figura, en esta realización, la conexión de la mitad superior 1535a con la mitad inferior 1535b tiene como resultado la compresión de la placa de reacción 1510 en, y cerca del área donde la membrana 1520 está en contacto con la placa de reacción 1510.

La figura 16 representa otra realización del dispositivo. En la figura 16A, el dispositivo se representa en su estado cerrado. En la figura 16B, el dispositivo se representa en su estado abierto. En esta realización, el dispositivo 16 comprende un recipiente de plástico articulado que comprende una mitad superior 1635a y una mitad inferior 1635b. La mitad inferior 1635b comprende un orificio 1655 de carga de muestras, y contiene una combinación unitaria de la

placa 1651 de carga de aplicación de la muestra líquida, la placa de filtración 1670 y la placa de reacción 1610. La mitad superior 1635a está acoplada a la mitad inferior 1635b mediante una articulación flexible 1680, que está fabricada del mismo material de plástico que el resto del recipiente 1635. La mitad superior 1635a contiene la placa de recepción de la solución de lavado 1640 y la membrana porosa 1620. La membrana porosa 1620 comprende por lo menos un elemento de par de unión específico (no representado).

Cuando está en su posición cerrada, la membrana 1620 está intercalada entre la placa de reacción 1610 y la placa de recepción de la solución de lavado 1640, y está en contacto con ambas placas, realizándose el contacto entre la placa de reacción 1610 y la membrana 1620 por lo menos sobre una parte de la membrana 1620 que comprende por lo menos un elemento de par de unión específico (no representado). La muestra se aplica a la placa de aplicación 1651 a través del orificio de aplicación 1655, y la muestra se desplaza a través de la placa de aplicación 1651 y de la placa de filtración 1670 a la placa de reacción 1610. La parte de la muestra presente en la placa de reacción 1610 se difunde entrando y saliendo de la membrana 1620, y contacta con el elemento o elementos de par de unión específicos, donde la sustancia de interés, si está presente, se une al elemento o elementos de par de unión específicos y es retenida en la membrana 1620.

Después de una cantidad de tiempo suficiente para la reacción de la sustancia con el elemento o elementos de par de unión específicos, la mitad superior 1635a y la mitad inferior 1635b se separan mediante el movimiento de las dos alrededor de la articulación 1680. Si se utiliza un marcador directo, puede ser añadido en este momento, o puede haber estado presente en la placa de reacción 1610, la placa de filtración 1670 o la placa de aplicación 1651, y haberse unido ya a la sustancia de interés. Cuando se utiliza un marcador directo, la detección de la presencia de la sustancia se puede realizar en este momento, o se puede lavar la membrana 1620 para mejorar la relación señal/ruido. Si se lleva a cabo un lavado, se añade la solución de lavado a la membrana 1620, y la solución de lavado es absorbida (después de fluir por la membrana 1620) por la placa de recepción de la solución de lavado 1640. Si se utiliza un marcador indirecto, el marcador (o el sustrato para el marcador, si el marcador ha sido incorporado a la placa de aplicación 1651, la placa de filtración 1670 o la placa de reacción 1610) se aplica a la membrana 1620 después de la separación de la mitad superior 1635a y la mitad inferior 1635b, y se deja que permanezca en contacto con la membrana 1620 durante una cantidad de tiempo suficiente para reaccionar con la sustancia unida al elemento de par de unión específico. A continuación se aplica una solución de lavado a la membrana 1620, tal como se ha descrito anteriormente. Cuando es necesario, el sustrato para el marcador indirecto se aplica a continuación a la membrana 1620 y se deja que permanezca en contacto durante una cantidad de tiempo suficiente para que se forme un complejo entre el marcador y el sustrato del marcador, o para que se genere una señal detectable.

La figura 17 representa un dispositivo 17, que muestra una realización de la invención en la que una membrana de plástico 1745 impermeable al líquido está colocada entre una placa de reacción 1710 y una placa de recepción de la solución de lavado 1740 en el interior del recipiente 1735. En esta realización, se aplica a la membrana 1720 una muestra líquida que se ha aclarado para eliminar material particulado grande, y a la que se ha añadido el conjugado, y se deja que fluya a la placa de reacción 1710, que está en contacto con la membrana 1720. Se proporciona el tiempo suficiente para la difusión de la muestra entre la placa de reacción 1710 y la membrana 1720, de tal modo que la sustancia de interés, si está presente, se une por lo menos a un elemento de par de unión específico (no representado). Después del transcurso de una cantidad de tiempo suficiente, se extrae la barrera impermeable 1745 tirando de la lengüeta 1747. Se aplica la solución de lavado a la membrana 1720, y se lava en la membrana 1720 el exceso de solución de lavado y de sustrato no unido, de conjugado y de complejo conjugado-sustrato, haciendo que pase a la placa de reacción 1710 y a continuación a la placa de recepción de la solución de lavado 1740. A continuación, se obtiene la detección de la presencia de la sustancia mediante la detección directa de una señal desde el elemento o elementos de par de unión específicos (no representados) o el entorno de los mismos, o mediante la adición de sustrato para el marcador. En este momento se pueden realizar uno o varios lavados adicionales.

La figura 18 representa otra realización del dispositivo. En esta configuración, el dispositivo 18 comprende el recipiente 1835, que comprende un orificio 1855 para muestras y la placa de aplicación de la muestra 1851, que están dispuestos junto a, y conectados a la placa de reacción 1810 y a la membrana 1820. La placa de recepción de la solución de lavado 1840 está situada debajo de la placa de reacción 1810 y está separada de la placa de reacción 1810 mediante una membrana impermeable 1845. La extracción de la membrana impermeable 1845 tirando de la lengüeta 1847 permite que la placa de recepción de la solución de lavado 1840 y la placa de reacción 1810 entren en contacto directo, y proporciona un flujo continuo desde la membrana 1820 a la placa de recepción de la solución de lavado 1840. En la práctica, esta configuración del dispositivo se utiliza de manera similar a la descrita con respecto a la figura 17, con la excepción de que la muestra se añade en el orificio 1855 de aplicación de muestras en lugar de a través de la membrana 1820.

La figura 19 representa una realización similar a la que se representa en la figura 16. La figura 19A representa el dispositivo en una posición cerrada. La figura 19B representa el dispositivo en una posición abierta. Tal como se puede ver en la figura 19A, el dispositivo 19 comprende un recipiente que comprende una mitad superior 1935a y una mitad inferior 1935b, conectadas mediante una articulación 1980. La mitad superior 1935a comprende la placa de reacción 1910, que es integral con la placa de aplicación de la muestra 1951, y que se mantiene en posición

mediante el soporte 1936. La membrana 1920 está situada entre la placa de reacción 1910 y la placa de recepción de la solución de lavado 1940, en contacto físico directo con ambas mediante la presión ejercida sobre la membrana 1920 por el soporte 1936. La mitad inferior 1935b comprende la placa de recepción de la solución de lavado 1940, en contacto físico directo con la membrana 1920. En la práctica de una realización del método con esta configuración del dispositivo, tal como se representa en la combinación de la figura 19A y la figura 19B, la muestra (a la que se ha añadido un conjugado marcador) se aplica a la placa de aplicación 1951 (que es integral con la placa de reacción 1910 y la placa de filtración 1970), y se permite que el líquido de la muestra se desplace a la placa de reacción 1910 y se difunda entrando y saliendo de la membrana 1920. La solución de lavado se añade a la placa de aplicación de la muestra 1951 y se extrae a través de la placa de reacción 1910 y de la membrana 1920, extrayendo el líquido hacia la placa de recepción de la solución de lavado 1940 como resultado de estar éste seco. A continuación se aplica el sustrato para el conjugado marcador a la membrana 1920, y las dos mitades 1935a y 1935b se separan por rotación en torno a la articulación 1980, dejando por lo tanto al descubierto la membrana 1920. La presencia de la sustancia se detecta mediante métodos de detección visual o no visual, evaluando la señal emitida desde, o desde la cercanía de por lo menos un elemento de par de unión específico (no representado) incorporado en la membrana 1920.

La figura 20 es una configuración del dispositivo 20 de la invención, que comprende el recipiente 2035, y en la que la placa de aplicación 2051 es integral con la placa de reacción 2010, y en la que el orificio de aplicación 2055 está situado bajo/sobre la membrana 2020 y la ventana de detección 2060, y en el lado opuesto de las mismas. La placa de recepción de la solución de lavado 2040 está en contacto directo con la placa de aplicación 2051 y la placa de reacción 2010, y está situada en el lateral de estas placas, con respecto al orificio de aplicación 2055 y la ventana de detección 2060. En la práctica de una realización del método con esta configuración del dispositivo, la muestra (a la que se ha añadido el conjugado) se aplica a la placa de aplicación 2051 a través del orificio de aplicación 2055, y se permite que la muestra atraviese la placa de reacción 2010, y se difunda entre la placa de reacción 2010 y la membrana 2020, que comprende por lo menos un elemento de par de unión específico (no representado). El dispositivo 20 se invierte después de que la muestra líquida se ha extraído del todo, o sustancialmente del todo por la placa de aplicación 2051 y la placa de reacción 2010, y se ha producido una cantidad de difusión deseada entre la placa 2010 y la membrana 2020. Se aplica la solución de lavado a la membrana 2020, y se extrae a través de la placa de reacción 2010 y de la placa de aplicación 2055 a la placa de recepción de la solución de lavado 2040. Se añade el sustrato para el conjugado y se lleva a cabo la detección de la presencia de la sustancia de interés en el líquido, de acuerdo con métodos conocidos y con la descripción anterior. Igual que en todas las demás realizaciones en las que se utiliza un marcador indirecto, es preferible la incubación del sustrato y del marcador para obtener una intensidad de señal óptima.

La figura 21 representa una realización del dispositivo de la invención, a la que se hace referencia asimismo en un ejemplo siguiente. En general, la realización comprende los elementos explicados anteriormente con respecto a otras realizaciones. En una realización particular del dispositivo representado en la figura 21, el dispositivo comprende una abertura de la ventana de reacción sobre una membrana porosa que comprende dos líneas de anticuerpos inmovilizados incorporados en las mismas. Por ejemplo, esta puede contener una línea de prueba (o línea "T"), que tiene anticuerpos contra la toxina A, la toxina B o ambas, de toxina C. difficile. Puede contener asimismo una segunda línea (o línea "C") que actúa como control interno, que tiene por ejemplo anticuerpos anti-IgG u otros anticuerpos específicos para otros antígenos. En uso, el dispositivo puede detectar la presencia de una sustancia de interés, tal como la toxina A y/o B, en una muestra. Por ejemplo, se puede añadir una muestra a un tubo que contiene una mezcla de un diluyente (por ejemplo, una solución de proteína tamponada que contiene el 0,02% de timerosal) y un conjugado (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón específico para la toxina A acoplado a peroxidasa de rábano picante y un anticuerpo policlonal de cabra específico para la toxina B acoplado a peroxidasa de rábano picante en una solución de proteína tamponada que contiene el 0,02% de timerosal). La mezcla muestra-conjugado diluida se puede añadir a continuación a un pozo de muestras, que es una abertura en la carcasa del dispositivo, y que se abre en un material poroso (placa de filtro) en un área para recibir la muestra, que no es la ventana de reacción. Después de añadir la muestra diluida al material poroso a través del pozo de muestras, el dispositivo se puede incubar a una temperatura adecuada, por ejemplo a temperatura ambiente, durante una cantidad de tiempo suficiente, por ejemplo 15 minutos. Durante este periodo de incubación, la sustancia de interés (por ejemplo, la toxina A y/o B), si está presente en la muestra, se une al conjugado (por ejemplo, conjugado anticuerpo anti-toxina-peroxidasa). Después de la aplicación de la muestra al dispositivo, los complejos sustancia-conjugado (por ejemplo, toxina-anticuerpo), si están presentes, migran a través de, por lo menos, un material poroso a la membrana porosa que contiene los anticuerpos inmovilizados. Se dispone una cantidad de tiempo suficiente (por ejemplo, un minuto) para la difusión de los complejos entrando y saliendo de la membrana porosa. Los complejos, si están presentes, son capturados por los anticuerpos inmovilizados en la línea o líneas. La membrana porosa, por lo menos en el área que comprende una parte de las líneas, se puede a continuación lavar opcionalmente con un tampón de lavado (por ejemplo, una solución tamponada que contiene el 0,02% de timerosal). El dispositivo se puede desarrollar a continuación con la adición de un sustrato (por ejemplo, una solución que comprende tetrametilbencidina). Después de un periodo de incubación (por ejemplo, 10 minutos), la presencia de un complejo en la línea de prueba se puede determinar, por ejemplo, examinando visualmente el aspecto de una línea (por ejemplo, una línea azul) en el área en que está presente la línea "T" en la membrana porosa bajo la ventana de reacción. Una línea en este área indica una prueba positiva. Cuando hay una línea (por ejemplo, línea azul) en el área "C" de la membrana porosa bajo la ventana de reacción, se ha producido una reacción de control positiva, que

indica que el dispositivo y el método están funcionando adecuadamente, y que los resultados (presencia o ausencia de la sustancia de interés) son válidos. Cuando se realiza un control, el control puede incluir un antígeno adecuado para un anticuerpo incorporado en la membrana en la línea "C", tal como un antígeno en una solución acuosa tamponada. Las figuras 21A-D representan a las líneas descritas en la presente memoria, e indican diversos resultados posibles.

Por lo tanto, la patente describe un método para detectar por lo menos una sustancia de interés en una muestra líquida, donde el método comprende: proporcionar una muestra líquida que comprende, o presuntamente comprende la sustancia o sustancias de interés; aplicar la muestra líquida a un material poroso en cantidad suficiente para humedecer, por lo menos parcialmente, el material poroso; poner en contacto el material poroso con una membrana porosa que comprende por lo menos un elemento de par de unión específico apto para una unión, ya sea directa o indirecta, con la sustancia o sustancias de interés; mantener el material poroso y la membrana porosa en contacto durante una cantidad de tiempo suficiente para que el líquido presente en el material poroso se difunda entrando, saliendo, atravesando y/o alrededor de la membrana porosa, donde la difusión del líquido entrando, saliendo, atravesando y/o alrededor de la membrana porosa tiene como resultado el contacto de la sustancia o sustancias de interés, si están presentes, para la unión, ya sea directa o indirectamente, con el elemento o elementos de par de unión específicos; y detectar la presencia o ausencia de un complejo que comprende el elemento o elementos de par de unión específicos y la sustancia o sustancias de interés, donde la presencia de por lo menos un complejo indica la presencia de por lo menos una de las sustancias de interés en la muestra líquida. En algunas realizaciones, el método puede comprender además un dispositivo que comprende el material poroso y la membrana porosa. En algunas realizaciones, el material poroso filtra la muestra líquida para eliminar sustancias que tengan un tamaño mayor de un valor predeterminado. En algunas realizaciones, el filtrado se realiza por medio de la infiltración discontinua de líquido desde la muestra líquida a través del material poroso. En algunas realizaciones, el método puede ser utilizado junto con un líquido que comprende dos o más sustancias de interés, y una, dos o más de estas sustancias pueden ser detectadas utilizando un único dispositivo y/o una única práctica del método. Por lo tanto, en ciertas realizaciones del método, cada sustancia de interés es diferente de cada una de las otras sustancias de interés, y el método detecta una, dos o más de las mismas. El método se puede practicar sobre muestras líquidas que contienen heces, sangre, un alimento, o en una muestra ambiental (por ejemplo, una sustancia tóxica en aguas subterráneas). En realizaciones a modo de ejemplo, el método detecta una o varias de toxina A de Clostridium difficile y toxina B de Clostridium difficile. En realizaciones, la sustancia de interés es una o varias toxinas, bacterias, virus, productos bacterianos, enzimas (por ejemplo, procarióticos, eucarióticos) o parásitos. En algunas realizaciones, la sustancia de interés es glutamato deshidrogenasa. Puede ser asimismo un producto animal o humano, un anticuerpo o una lactoferrina.

El método se puede practicar utilizando uno o varios elementos de par de unión específicos. Uno o varios del elemento o elementos de par de unión específicos son un anticuerpo, y cuando se utilizan una serie de anticuerpos como elementos de par de unión específicos, cada uno de los anticuerpos puede ser diferente o el mismo que uno u otros anticuerpos.

El método general puede comprender además el lavado de la membrana antes de la detección de la presencia de un complejo.

En realizaciones, la aplicación de la muestra líquida al material poroso comprende aplicar la muestra líquida en una posición en el material poroso que está separada especialmente de la membrana porosa, por lo que por lo menos el líquido de la muestra líquida se desplaza al material poroso y a continuación a la membrana porosa. En ciertas realizaciones, la muestra líquida que se aplica en un sector de una zona de carga de muestras que es distante de una zona de detección se desplaza a través del material poroso hasta la membrana porosa por medio de un proceso de infiltración. En algunas realizaciones, se aplica una fuerza física a la membrana, al material poroso o ambos, y dicha fuerza mejora la sensibilidad del dispositivo y del método.

El método comprende detectar una señal para determinar la presencia de una sustancia de interés. En algunas realizaciones, la detección comprende observar una señal emitida desde un marcador unido a la sustancia de interés. En realizaciones particulares, la señal es producida por un producto de precipitación coloreado que se forma en, o alrededor del elemento de par de unión específico. Por lo tanto, la detección puede ser por medio de la detección de un complejo. Por lo tanto, el método puede comprender la combinación de un conjugado marcado con la muestra líquida, antes de la aplicación de la muestra líquida al material poroso. El conjugado marcado puede comprender una microesfera de látex u otra partícula coloreada, una partícula de oro coloidal o una sustancia reactiva que se una a una sustancia para crear una señal detectable. En algunas realizaciones, la señal es una señal no visual.

La invención incluye un dispositivo según la reivindicación 1. El dispositivo comprende una placa de recepción de la solución de lavado y una placa de aplicación de muestras líquidas. El dispositivo puede comprender un soporte para la membrana porosa, una placa de filtrado o dos de estos elementos. Cada elemento puede estar subdividido en dos o más zonas funcionales que, si bien están fabricadas opcionalmente del mismo material, se pueden fabricar de materiales diferentes respecto de una o varias de las otras zonas.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un recipiente que contiene una placa de reacción que comprende el material poroso y la membrana porosa, comprendiendo el recipiente un soporte para la membrana porosa, donde el recipiente hace que se ejerza presión sobre la membrana porosa y/o el material poroso de tal modo que por lo menos una parte del material poroso se comprime. Por supuesto, el recipiente puede contener otros elementos, tal como se ha explicado anteriormente. La compresión del material poroso puede hacer que la membrana porosa y el material poroso estén en contacto directo sobre por lo menos una parte de la membrana porosa, y puede mejorar la función del dispositivo y del método de la invención. Por ejemplo, la presión puede permitir que uno o varios líquidos pasen entre la membrana porosa y el material poroso por difusión pasiva.

La patente describe asimismo un dispositivo para detectar por lo menos una sustancia de interés en una muestra líquida, donde el dispositivo comprende: (a) un receptáculo que comprende un material poroso para recibir la muestra líquida, donde el material poroso puede absorber y transmitir por lo menos una parte de la muestra líquida, y (b) una membrana porosa que comprende un elemento de par de unión específico que es específico para la sustancia de interés o para una sustancia unida a la sustancia de interés, donde el receptáculo y la membrana porosa están conformados cada uno para permitir que la membrana porosa esté en contacto directo con el material poroso sobre por lo menos una parte de la membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico, donde la membrana porosa y el material poroso son elementos diferentes que tienen una constitución química diferente. En algunas realizaciones, la membrana porosa y el material poroso están en contacto físico de tal modo que la muestra líquida aplicada al material poroso se difunde entrando, saliendo, atravesando y rodeando la membrana porosa. Además, el dispositivo puede estar construido de tal modo que se crea el contacto físico entre la membrana porosa y el material poroso de manera que se mejora la sensibilidad del dispositivo. El dispositivo puede estar configurado de tal modo que el material poroso y la membrana porosa estén en contacto entre sí de manera que la sustancia de interés no tenga que atravesar la membrana porosa de manera unidireccional para que el dispositivo detecte la sustancia de interés. En realizaciones a modo de ejemplo, el material poroso y la membrana porosa están en contacto entre sí de manera que permiten que se produzca una difusión simple, no direccional, de un líquido entre los dos.

La patente describe asimismo un dispositivo para la detección de la presencia o de una cantidad de una sustancia de interés en una muestra líquida, donde el dispositivo comprende: una zona de recepción de la muestra para recibir la muestra líquida, donde la zona de recepción de la muestra está presente en un material poroso; una zona de filtro de la muestra para filtrar la muestra líquida recibida en la zona de recepción de la muestra, donde la zona de filtrado de la muestra está presente en un material poroso; una membrana porosa que comprende un elemento de unión específico en una zona de detección, que se une específicamente a la sustancia de interés o a una sustancia unida a la sustancia de interés, donde la membrana porosa no es el mismo elemento que cualquiera de los materiales porosos, y donde el material poroso y la membrana porosa están en contacto físico sobre por lo menos un área que comprende una parte de la zona de detención, y donde el material poroso y la membrana porosa están en contacto físico en una configuración que permite que el líquido presente en la muestra líquida se difunda entrando, saliendo, atravesando y rodeando la membrana porosa de manera sustancialmente aleatoria, no direccional, en un área que comprende por lo menos una parte de la zona de detección. Por supuesto, pueden estar presentes una o varias zonas en un único material poroso o en dos o más materiales diferentes. Análogamente, estas pueden estar presentes en dos o más materiales diferentes, seleccionados cada uno independientemente para que tengan una composición igual o diferente a uno o varios de los otros. Tal como se ha mencionado anteriormente, el dispositivo puede comprender un recipiente que contenga por lo menos una parte del material o materiales porosos y de la membrana porosa. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un material poroso que comprende una zona de recepción de la solución de lavado.

En los ejemplos que siguen se proporcionan otras realizaciones a modo de ejemplo del dispositivo de la invención, y de la utilización del dispositivo en la práctica del método, y otras resultarán evidentes a partir de la descripción y de los dibujos.

EJEMPLOS

La invención se explicará además mediante los ejemplos siguientes, que están destinados a ser tan sólo ejemplares de la invención, y no se deberá considerar que limitan la invención en modo alguno.

Ejemplo 1: utilización de una realización del dispositivo de la invención y el método

Este ejemplo detalla una utilización in vitro típica y orientaciones para la utilización in vitro de una realización del método de la invención, en una realización del dispositivo de la invención, que se representa en las figuras 21A-D, en el que se detectan toxinas A y B de Clostridium difficile. El protocolo sigue, en general, el protocolo dado a conocer en el kit TOX A/B QUIK CHEK™ (TechLab, Blacksburg, VA; art. núm. T5033), que se incorpora en su integridad como referencia a la presente memoria. Salvo que se indique lo contrario, en los ejemplos se utilizó el protocolo dado a conocer en el kit TOX A/B QUIK CHEK™. Se proporcionan orientaciones generales en este ejemplo y en el kit TechLab, pero no son necesariamente aplicables a otras realizaciones del método de la invención.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE ESPECÍMENES FECALES

Los métodos estándar utilizados para la recogida y manipulación de especímenes fecales son adecuados. Los especímenes se deberán almacenar entre 2° C y 8° C. Es preferible realizar la prueba en especímenes que tienen menos de 24 horas. Es preferible almacenar especímenes congelados (a -10° C o menos) si la prueba no se puede llevar a cabo en las 72 horas siguientes a la recogida. Aunque los datos muestran que un ciclo de congelación-descongelación no perjudica la muestra para su utilización con toxinas A y B de C. difficile, se debe observar que la congelación y descongelación de un espécimen, especialmente múltiples veces, puede tener como resultado una pérdida de actividad debido a la degradación de las toxinas. Los especímenes fecales que se han conservado en Formalin al 10%, MF, SAF, o PVA, o los especímenes que están en medios de transporte tales como Cary Blair o C&S no proporcionan habitualmente resultados tan óptimos como las muestras frescas o las conservadas en otras composiciones.

Los especímenes deberían ser mezclados minuciosamente (por ejemplo, agitados) antes de llevar a cabo el ensayo. No se recomienda el almacenamiento de especímenes fecales en el diluyente. Es preferible llevar a cabo inmediatamente la prueba en la muestra una vez que el espécimen fecal se ha diluido en el diluyente. Se pueden utilizar pipetas desechables graduadas a 50, 100, 200 y 300 µl.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Opcionalmente, poner todos los reactivos y dispositivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
- Preparar un casete (dispositivo) para cada espécimen a probar.
- Añadir de 0,4 a 0,6 ml (por ejemplo, 0,425 ml ó 0,5 ml) de diluyente a cada tubo de dilución utilizando un cuentagotas de plástico.
- Suspender homogéneamente (por ejemplo, agitar) los especímenes antes de su transferencia. Para especímenes líquidos/semisólidos, extraer el espécimen a la mitad del recorrido hasta la primera marca desde el extremo (25 µl). Administrar el espécimen al diluyente. Utilizar la misma pipeta para mezclar el espécimen diluido aspirando suavemente, administrando a continuación la mezcla varias veces. Para especímenes formados/sólidos, mezclar minuciosamente el espécimen. Utilizando una varilla de aplicación de madera, transferir una pequeña parte (de aproximadamente 2 mm de diámetro) del espécimen al diluyente. Emulsionar el espécimen utilizando la varilla de aplicación. A modo de control opcional, añadir 1 gota de control positivo o control negativo (diluyente del espécimen) a tubos que contienen 0,4 ml de diluyente.
- Añadir 1 gota de conjugado al espécimen diluido y mezclar los contenidos del tubo agitando.

MÉTODO DE LA PRUEBA

- Obtener el número requerido de casetes, una por espécimen, y una por control positivo o negativo. Marcar adecuadamente los casetes de membrana.
- Obtener las muestras preparadas. Utilizando una pipeta de transferencia desechable, transferir de 300 a 400 µl de la mezcla muestra diluida-conjugado en el orificio de muestras del casete e incubar el casete a temperatura ambiente durante 15 minutos. En la ventana de resultados será visible un área húmeda creciente. Si no aparece un área húmeda en la ventana de resultados, añadir 100 µl de diluyente al orificio de la muestra y esperar 5 minutos adicionales.
- Después de 15 minutos, añadir 300 µl de tampón de lavado al orificio de reacción. Dejar que el tampón de lavado entre por completo en el orificio de reacción.
- Añadir 2 gotas de sustrato al orificio de reacción y dejar el casete incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. A la finalización de los 10 minutos, leer los resultados en la ventana de detección. Observar la aparición de una línea coloreada (por ejemplo, azul) que representa la línea de control (ver la figura 21A). Las líneas se pueden presentar de un color de débil a oscuro.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Resultado positivo (figura 21A): son visibles dos líneas, una en la parte inferior del orificio de reacción (línea de control) y una en la parte superior del orificio de reacción (línea de prueba). Un resultado positivo indica la presencia de toxina C. difficile y un control reactivo adecuado.

Resultado negativo (figura 21B): solamente es visible una línea de control en la parte inferior del orificio de reacción. No es visible ninguna línea de prueba en la parte superior del orificio de reacción. Un resultado negativo indica la ausencia de toxina C. difficile pero un control reactivo adecuado.

Resultado inválido (figuras 21C y 21D): todas las reacciones completadas deberían tener una línea de control visible en la parte inferior del orificio de reacción. La prueba no es válida si no hay presente una línea de control en el casete finalizado.

Ejemplo 2: comparación de la detección de toxina más A y B de Clostridium difficile utilizando el dispositivo de la invención y cultivo de tejidos.

Se utilizó una realización del dispositivo de la invención, para detectar una combinación de toxina A y toxina B de C. difficile en 50 muestras fecales, y los resultados se compararon con resultados obtenidos para las mismas muestras utilizando métodos de cultivo de tejidos. La detección por cultivo de tejidos de la toxina C. difficile en muestras

fecales es el ensayo elegido reconocido en la técnica, debido a que se considera que es el método más sensible para la detección de toxinas. Se utilizó el método descrito en el ejemplo 1 para detectar las toxinas.

La prueba por cultivo de tejidos fue el kit de prueba C. difficile Tox-B fabricado por TechLab, Inc. (art. núm. T5003), y el método fue el que se describe en el prospecto del producto. En resumen, se diluyeron muestras fecales en proporción 1:10 en el diluyente y se filtraron por medio de un filtro estéril de 0,45 micras. Se añadió cada muestra fecal (50 microlitros) a cada uno de los dos pozos de cultivo de tejidos. Un pozo recibió 50 microlitros de antitoxina para neutralizar toxinas A y B de C. difficile y el otro pozo recibió 50 microlitros solamente de tampón fosfato salino. Las células de tejido cultivado de prepucio humano se incubaron a 37° C durante 24 horas y a continuación se examinó la redondez de las células, y se volvieron a examinar 48 horas después. Se consideraron positivos los pozos en los que más del 50 % de las células eran redondeadas. Para una reacción global positiva, el pozo que contenía antitoxina tenía que ser normal mientras que el pozo sin antitoxina tenía que mostrar redondez de las células.

La tabla 1 muestra los resultados de los ensayos, y compara los resultados del método y el dispositivo de la presente invención con el ensayo de cultivo de tejidos.

Tabla 1:

N=.50	A/B invención pos.	A/B invención neg.
Cult. de tej. pos.	8	0
Cult. de tej. neg.	1	41
Sensibilidad	88,9	
Especificidad	100,0	
Val. pos. pred.	100,0	
Val. neg. pred.	97,6	
Correlación	98,0	

Los resultados indican que un dispositivo y un método de la presente invención se comporta de manera casi idéntica a un cultivo de tejidos.

Ejemplo 3: comparación de detección de toxinas A y B de Clostridium difficile utilizando el dispositivo de la invención y ELISA.
Se utilizó un dispositivo de la invención para detectar una combinación de toxina A y toxina B de C. difficile en 50 muestras fecales, y los resultados se compararon con los resultados obtenidos para las mismas muestras utilizando ELISA. Se utilizó el método descrito en el ejemplo 1 para detectar las toxinas.

En este experimento se utilizó el kit TechLab Inc. Tox A/B Test según las directrices del prospecto del producto. En resumen, se diluyeron heces en concentración 1:5 en un diluyente de la muestra y se añadieron 100 microlitros a los pozos en una placa de pozos ELISA 96. A continuación se añadió a cada pozo 50 microlitros de solución de conjugado (que contiene anticuerpos de las toxinas A y B de C. difficile que se conjugaron con peroxidasa de rábano picante). Se incubaron los pozos durante 50 minutos a 37° C y a continuación se lavaron los pozos para eliminar el conjugado de peroxidasa de rábano picante que no se unió a las toxinas (que se unió a los anticuerpos que recubrían los pozos). El sándwich de anticuerpos y de enzimas se detectó a continuación añadiendo 100 microlitros de solución de sustrato con una incubación de 10 minutos seguida por la adición de 50 microlitros de ácido diluido para detener la reacción. Las reacciones positivas fueron aquellos pozos con una densidad óptica a 450 nm de más de 0,12.

La tabla 2 muestra los resultados de los ensayos, y compara los resultados del método y el dispositivo de la presente invención con el ensayo ELISA.

Tabla 2:

N=50	A/B invención pos.	A/B invención neg.
C. DIFF NB II pos	8	1
C. DIFF A/B II neg	1	40
Sensibilidad	88,9	
Especificidad	97,6	
Val. pos. pred.	88,9	
Val. neg. pred.	97,6	
Correlación	96,0	

Los resultados indican que el dispositivo y el método de la presente invención produce resultados que son comparables con el método ELISA sensible utilizado.

Ejemplo 4: investigación de la sensibilidad relativa del dispositivo de la invención y del método

Se determinó la sensibilidad de un dispositivo de la invención y de un método. El dispositivo y el método utilizados fueron los de la prueba TOX A/B QUIK CHEK™ para toxinas A y B (TechLab, Inc.). En resumen, se determinó la sensibilidad del dispositivo y del método utilizando diluciones dobles en serie de toxinas A y B muy purificadas.

La prueba fue sistemáticamente positiva a una concentración de 0,63 ng/ml para la toxina A y de 1,25 ng/ml para la toxina B. En las tablas siguientes se muestran los resultados de seis pruebas independientes (pruebas 1 a 6) con toxina A o toxina B diluidas en serie para la prueba.

Tabla 3: reacción de toxina A muy purificada en la prueba TOX A/B QUIK CHEK™

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6
Conc. (ng/ml)						
1,25	+	+	+	+	+	+
0,63	+	+	+	+	+	+
0,32	+	+	-	+	+/-	+/-
0,16	-	-	+/-	-	-	-
0,08	-	-	-	-	-	-

Tabla 4: reacción de toxina A muy purificada en la prueba TOX A/B QUIK CHEK™

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6
Conc. (ng/ml)						
1,25	+	+	+	+	+	+
0,63	-	-	-	-	+	+
0,32	-	-	-	-	-	-
0,16	-	-	-	-	-	-
0,08	-	-	-	-	-	-

Los datos presentados en las tablas 3 y 4 son representativos de los resultados particulares obtenidos en las series de pruebas particulares llevadas a cabo. En otras pruebas, se ha observado a menudo una sensibilidad de 0,16 para la toxina A y de 0,32 a 0,63 para la toxina B.

Ejemplo 5: reproductibilidad y precisión de un aparato y método

Para determinar la reproductibilidad de la precisión de los dispositivos de invención y de los métodos, se probó una realización del dispositivo de la invención, tal como se representa en la figura 21, utilizando una realización del método, de acuerdo con un protocolo suministrado con la prueba TechLab TOX A/B QUIK CHEK™. Más específicamente, se probaron un total de 8 especímenes fecales, 6 positivos y 2 negativos, en tres diferentes laboratorios utilizando la prueba a TOXA/B QUIK CHEK™ A (TechLab art. núm. T5033) según las instrucciones del fabricante. Para probar el límite, se incluyeron en los 6 especímenes positivos 2 especímenes débilmente positivos que proporcionaron líneas débiles cuando fueron analizados por los inventores. Todos los especímenes se clasificaron mediante un dispositivo probado, la prueba de C. difficile TOX A/B II™ (TechLab, art. núm. T5003), que está aceptada ampliamente como una prueba muy sensible y precisa para la presencia de toxinas A y B de C. difficile. Todos los especímenes se mantuvieron congelados a -10° C hasta que se llevó a cabo el ensayo. Cada uno de los laboratorios sometió a prueba los especímenes en 3 días diferentes. Los resultados de cada laboratorio se presentaron a continuación a los inventores y se compararon con los propios resultados de los inventores. Los resultados, mostrados a continuación, fueron consistentes entre los diferentes emplazamientos, y presentaron una

correlación del 100%. Los especímenes positivos se confirmaron como positivos y los especímenes negativos se confirmaron como negativos en todos los emplazamientos utilizando la prueba TOX A/B QUIK CHEK™.

Tabla 5: prueba de reproducibilidad/precisión por los inventores, de muestras fecales utilizando un método según la invención.

Código de espécimen (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	Día 1	Día 2	Día 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Porcentaje de correlación	N/A	100	100	100

Tabla 6: prueba de reproducibilidad externa/precisión de muestras fecales utilizando un método según la invención

Código de espécimen (n=8)	TOX AB II™ ELISA	Día 1	Día 2	Día 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Porcentaje de correlación	N/A	100	100	100

Tabla 7: prueba de reproducibilidad externa/precisión de muestras fecales utilizando un método según la invención

Código de espécimen (n=8)	TOX AB II™ ELISA	Día 1	Día 2	Día 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Porcentaje de correlación	N/A	100	100	100

Tabla 8: prueba de reproducibilidad externa/precisión de muestras fecales utilizando un método según la invención

Código de espécimen (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	Día 1	Día 2	Día 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Porcentaje de correlación	N/A	100	100	100

Como se puede observar, el dispositivo y el método funcionaron bien en manos de cuatro facultativos diferentes.

Ejemplo 6: efecto de la congelación-descongelación sobre los especímenes
Para caracterizar mejor los dispositivos acordes con la invención y los métodos, se utilizó una realización del dispositivo junto con un método para determinar la adecuación de cada uno con especímenes que se sometieron a por lo menos un ciclo de congelación-descongelación.

Se sometió a prueba un total de ocho especímenes fecales, consistentes en 6 especímenes positivos y 2 negativos, utilizando una realización del dispositivo de la invención que se representa en la figura 21, y una realización de método la invención, que están ambos disponibles en la prueba TOX A/B QUIK CHEKT™ de TechLab, Inc. (art. núm. T5033), antes y después de un único ciclo de congelación-descongelación. Anteriormente, se había sometido a prueba la presencia o ausencia de toxinas A y B en los especímenes, en la prueba C. DIFFICILE TOX A/B II™ (TechLab, Inc.; art. núm. T5003). Los resultados se muestran en la tabla siguiente. Se incluye la reactividad residual en la prueba C. DIFFICILE TOX A/B II™ después del ciclo de congelación-descongelación. Los resultados mostraron que los especímenes positivos siguieron siendo positivos después del ciclo de congelación-descongelación y los especímenes negativos siguieron siendo negativos. La no conversión de positivo a negativo o de negativo a positivo se observó en cualquiera de los especímenes.

Tabla 9: efecto del ciclo de congelación-descongelación sobre el método de la invención

Código de espécimen (n=8)	TOX A/B II™ ELISA (antes de la congelación)	INVENCIÓN (antes de la congelación)	TOX AJB II™ ELISA (después de la congelación)	INVENCIÓN (después de la congelación)
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-

Ejemplo 7: efecto del almacenamiento de especímenes entre 2° y 8° C durante 72 horas
Para seguir investigando la utilización del método de la invención para la detección de sustancias de interés en muestras, se sometieron a prueba seis especímenes fecales positivos y dos negativos (con respecto a las toxinas A y B de C. difficile) en tiempos de 24, 48 y 72 horas utilizando un dispositivo según la presente invención y el método, específicamente en la prueba TOX A/B QUIK CHEK™ (TechLab, Inc.; art. núm. T5033) según las instrucciones del fabricante, para evaluar la estabilidad de las toxinas en las muestras fecales. Los resultados, mostrados a continuación, demuestran que el dispositivo y el método funcionaron de manera consistente en cada intervalo de tiempo. Además, muestran que las toxinas C. difficile son estables durante por lo menos 72 horas en estas condiciones de prueba. Todos los especímenes positivos siguieron siendo positivos y los especímenes negativos siguieron siendo negativos en cada periodo de tiempo.

Tabla 10: efecto del almacenamiento de especímenes entre 2° y 8° C durante 72 horas

Especímenes (n = 8)	Día 1 ensayo de C. difficile TOX A/B II™ de 20 minutos	Día 1 TOX A/B QUIK CHEK™	Día 2 C. difficile TOX A/B II™	Día 2 TOX A/B QUIK CHEK™	Día 3 ensayo de C. difficile TOX A/B II™ de 20 minutos	Día 3 TOX A/B QUIK CHEK™
TL001	+	+	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-	-	-

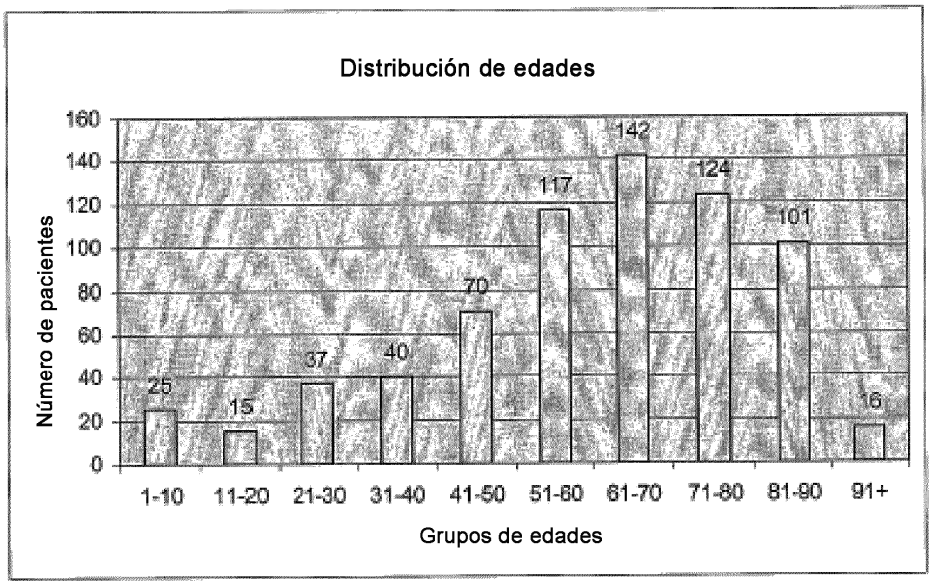
Ejemplo 8: utilización de un método y un aparato para probar muestras clínicas en un laboratorio clínico
Se utilizó el método y el aparato utilizados en los anteriores ejemplos 4 a 7, para analizar muestras clínicas que sospechaba contenían toxinas A y/o B de C. difficile. Más específicamente, los inventores compararon una realización del dispositivo descrito de la invención, acoplada con una realización del método, vendidas juntas por TechLab, Inc. con la marca registrada TOX A/B QUIK CHEK™ (TechLab; art. núm. T5033) con ensayos de cultivo de tejidos en 3 laboratorios clínicos comerciales. Los emplazamientos del estudio y los investigadores, junto con el número y la fuente de los especímenes, se presentan en la tabla siguiente. El dispositivo y el método se compararon

con el ensayo de cultivo de tejidos, dado que el ensayo de cultivo de tejidos se considera como el "estándar de oro" para detectar toxina C. difficile en muestras fecales. Los resultados discrepantes se analizaron utilizando la prueba de C. DIFFICILE TOX A/B II™ o bien la prueba de Meridian Premier™ Toxins A&B, siendo ambas ELISAs de microvaloración para detectar toxinas A y B en especímenes fecales. Para los estudios llevados a cabo por los inventores en este ejemplo, se llevó a cabo un ensayo de cultivo de tejidos utilizando el ensayo de C. DIFFICILE TOX-B TEST de TechLab, Inc.

Cuando se comparó el dispositivo de la invención y el método con el ensayo de cultivo de tejidos, se determinó la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivos y negativos, y el porcentaje de correlación. Se determinaron asimismo intervalos de confianza del 95 % para el análisis frente al ensayo de cultivo de tejidos.

Estuvo disponible la identificación de género para 294 pacientes. Había 177 mujeres (60,2%) y 117 hombres (39,8%) La información de edad estaba disponible para 613 pacientes. La edad variaba desde aproximadamente 1 año a 95 años, con la distribución mostrada en la tabla siguiente. El número debajo de cada barra en la tabla representa el número de pacientes que había en el grupo de edad específico.

Tabla 11: distribución de edades para el estudio clínico



Las tablas siguientes muestran un resumen del comportamiento clínico del dispositivo de la invención y el método. Se incluyen en el resumen los resultados de la totalidad de los 5 estudios clínicos llevados a cabo. Los resultados del dispositivo de la invención y el método se compararon con el ensayo de cultivo de tejidos y los resultados discrepantes fueron analizados por la prueba C. difficile TOX A/B™ (el dispositivo y el método de la invención explicados aquí) o bien por la prueba Meridian Premier™ Toxins A&B. Los resultados muestran que la prueba de TOX A/B QUIK CHEK™ presentó una sensibilidad y una especificidad del 90,2% y el 99,7%, respectivamente, en comparación con el ensayo de cultivo de tejidos. Los valores predictivos positivos y negativos fueron del 98,6% y el 97,9%, respectivamente, y la correlación fue del 98,0%.

Tabla 12: resumen del comportamiento clínico de un método de la invención

n=842	Muestras positivas de cultivo de tejidos	Muestras negativas de cultivo de tejidos
TOX A/B QUIK CHEK™ positivo	138	2
TOX A/B QUIK CHEK™ negativo	15	687
		Intervalo de confianza del 95 %
Sensibilidad	90,2	84,1 - 94,2
Especificidad	99,7	98,8 - 99,9
Valor positivo predictivo	98,6	94,4 - 99,8
Valor negativo predictivo	97,9	96,4 - 98,7
Correlación	98,0	97,8 - 98,2

De las 2 muestras cultivo de tejidos-negativa/TOXA/B QUIK CHEK™-positiva, 1 fue negativa en la prueba TOX A/B II™. De los 15 especímenes que fueron cultivo de tejidos-positivo/TOXA/B QUIK CHEK™- negativo, 12 fueron negativos en la prueba C. DIFFICILE TOX A/B II™ o en la prueba Meridian Premier™ Toxins A&B.

Ejemplo 9: efecto de la consistencia de los especímenes fecales.
Para caracterizar mejor el método y el dispositivo de la invención, una realización del dispositivo se probó con una realización del método para determinar el efecto de la consistencia de de los especímenes fecales sobre el rendimiento del dispositivo y el método.

La reacción de los especímenes fecales de consistencias variables en la prueba de TOX A/B QUIK CHEK™ se muestra en la tabla siguiente. Se incluyeron en el análisis un total de 805 muestras fecales de consistencia conocida. Los porcentajes de reacciones positivas utilizando cualquiera del ensayo de cultivo de tejidos o la prueba TOX A/B QUIK CHEK™ fueron similares en todos los tres tipos de especímenes fecales (líquidos, semisólidos y sólidos). Se presentaron todos los especímenes a la prueba de C. difficile. La base para la presentación fue la historia clínica del paciente y no la consistencia del espécimen. Los resultados muestran que la prueba de TOX A/B QUIK CHEK™ se comportó de manera similar al ensayo de cultivo de tejidos cuando se prueban muestras de consistencias diferentes.

Tabla 13: reacción de especímenes fecales de consistencias variables en la prueba TOX A/B QUIK CHEK™.

Tabla 13: reacción de especímenes fecales de consistencias variables en la prueba TOX A/B QUIK CHEK™.

# de especímenes (n=805)	Especímenes líquidos (n=487)	Especímenes semisólidos (n=294)	Especímenes sólidos (n=24)
Positivo mediante ensayo de cultivo de tejidos	87 (17,9%)	56 (19,0%)	3 (12,5%)
Positivo mediante TOX A/B QUIK CHEK™	76 (15,6%)	50 (17%)	3 (12,5%)

Ejemplo 10: Comparación de detección de Clostridium difficile glutamato deshidrogenasa utilizando el dispositivo de la invención y ELISA
Se utilizó el dispositivo de la invención para detectar el antígeno de glutamato deshidrogenasa de C. difficile en 49 muestras fecales, y los resultados se compararon con los obtenidos con un método ELISA. Se utilizó el método descrito en el ejemplo 1 para detectar las toxinas, con las modificaciones siguientes.

Las muestras fecales para utilizar en el dispositivo se diluyeron tal como se especifica en el ejemplo 1, con diluyente de la muestra que contiene anticuerpos (en este caso, específicos para la enzima de glutamato deshidrogenasa de C. difficile) que se han conjugado químicamente con enzima de detección de peroxidasa de rábano picante (conjugado). La muestra mezclada (300 microlitros) se aplicó a continuación a la placa de aplicación (placa de infiltración) a través de la abertura en el dispositivo (orificio de aplicación) y después de 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió solución de lavado (mezcla de suero salino/detergente) a la parte superior de la membrana, seguida por la solución de sustrato químico. Los resultados se leyeron visualmente tal como se especifica en el ejemplo 1.

Se utilizó ELISA Tox AB de TechLab Inc. tal como se especifica en el prospecto del producto del fabricante. En resumen, la muestra fecal se diluyó a una concentración de 1:5 en diluyente de la muestra y se mezcló por agitación. Cada pozo de la placa ELISA recibió 50 microlitros de solución de conjugado que contiene anticuerpos específicos para glutamato deshidrogenasa acoplado a peroxidasa de rábano picante, y a continuación se añadieron a cada pozo 100 microlitros de una muestra mezclada. La placa se incubó a continuación a 37° C durante 50 minutos para permitir que los anticuerpos acoplados a los micropozos y el anticuerpo en la solución de conjugado se unieran al glutamato deshidrogenasa. Los pozos se lavaron minuciosamente a continuación para eliminar la peroxidasa de rábano picante no unida. Se añadieron cien microlitros de solución de sustrato a cada pozo, se incubaron durante 5 minutos, y a continuación se detuvo la reacción añadiendo 50 microlitros de solución de ácido diluido. Los resultados se leyeron a 450 nm en un lector ELISA. Las muestras positivas tuvieron una densidad óptica mayor de 0,12.

La tabla 14 muestra los resultados de los ensayos, y compara los resultados del método y el dispositivo de la presente invención con el ensayo ELISA.

Tabla 14: comparación del método de la invención con un método ELISA

N=49	Ag. invención pos.	Ag. invención neg.
Chek. C. cliff. pos.	9	0
Chek. C. cliff. neg.	0	40
Sensibilidad	100,0	
Especificidad	100,0	
Valor positivo predicho	100,0	
Valor negativo predicho	100,0	
Correlación	100,0	

Los resultados indican que el dispositivo y el método de la presente invención produce resultados que son idénticos con el método ELISA sensible utilizado. Por lo tanto, los dispositivos de la invención y el método son adecuados para la detección de numerosas sustancias de interés.

Resultarán evidentes para los expertos en la materia otras realizaciones de la invención a partir de la consideración de la memoria, y de la práctica de la invención. Se prevé que la memoria y los ejemplos se consideren solamente a modo de ejemplo.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (2-20) para detectar por lo menos una sustancia de interés en una muestra líquida, comprendiendo el dispositivo:

(a) una unidad (200) que comprende un material poroso (210, 210) para recibir la muestra líquida, donde el material poroso (210, 910) puede absorber y transmitir por lo menos una parte de la muestra líquida,
(b) una membrana porosa (220, 920) que comprende un elemento de par de unión específico (230) que es específico para la sustancia de interés o una sustancia unida a la sustancia de interés, donde el elemento de par de unión específico es un anticuerpo, siendo el área del material poroso mayor que la de la membrana porosa para proporcionar una zona de aplicación de muestras líquidas que comprende una placa de aplicación de muestras, estando configurado el material poroso para permitir la difusión de la muestra líquida entre el material poroso y la membrana porosa, y
(c) una placa de recepción de la solución de lavado (840, 940),
en la que la unidad y la membrana porosa están, cada una, conformadas para permitir que la membrana porosa esté en contacto directo con el material poroso sobre por lo menos una parte de la membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico,
donde el material poroso está en contacto físico con un lado inferior de la membrana porosa que comprende el elemento de par de unión específico, estando localizado el elemento de par de unión específico sobre el material poroso, estando la membrana porosa en contacto directo con el material poroso en una posición en la que está localizado el elemento de par de unión específico,
comprendiendo además el dispositivo un recipiente que contiene la unidad, comprendiendo el recipiente un orificio de aplicación de muestras y una ventana de visualización separada respecto del orificio de aplicación de muestras, estando situados el orificio de aplicación de muestras y la ventana de visualización en un mismo lado del recipiente,
permitiendo el orificio de aplicación de muestras la aplicación de la muestra líquida a la placa de aplicación de muestras,
estando configurado el dispositivo para permitir la detección de la sustancia unida al elemento de par de unión específico visualizando la membrana porosa a través de la ventana de detección, y
donde el recipiente ejerce presión sobre material poroso desde abajo con respecto a la membrana porosa en la posición de la membrana porosa para provocar la compresión del material poroso en esta posición y en una posición de reacción del material poroso, y para asegurar el contacto completo de la membrana porosa y el material poroso sobre por lo menos una parte del área donde el elemento de par de unión específico está situado, y donde el material poroso comprende una placa de reacción que está comprimida comparada con la placa de aplicación de muestras y la placa de recepción de la solución de lavado.

2. El dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además una placa de filtrado (1470).

3. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el recipiente comprende un soporte (836) para la membrana porosa.

4. El dispositivo según la reivindicación 3, en el que la presión permite que pasen líquidos entre la membrana porosa y el material poroso por difusión pasiva.

5. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que la membrana porosa comprende dos más o áreas diferentes que contienen un elemento de par de unión específico.

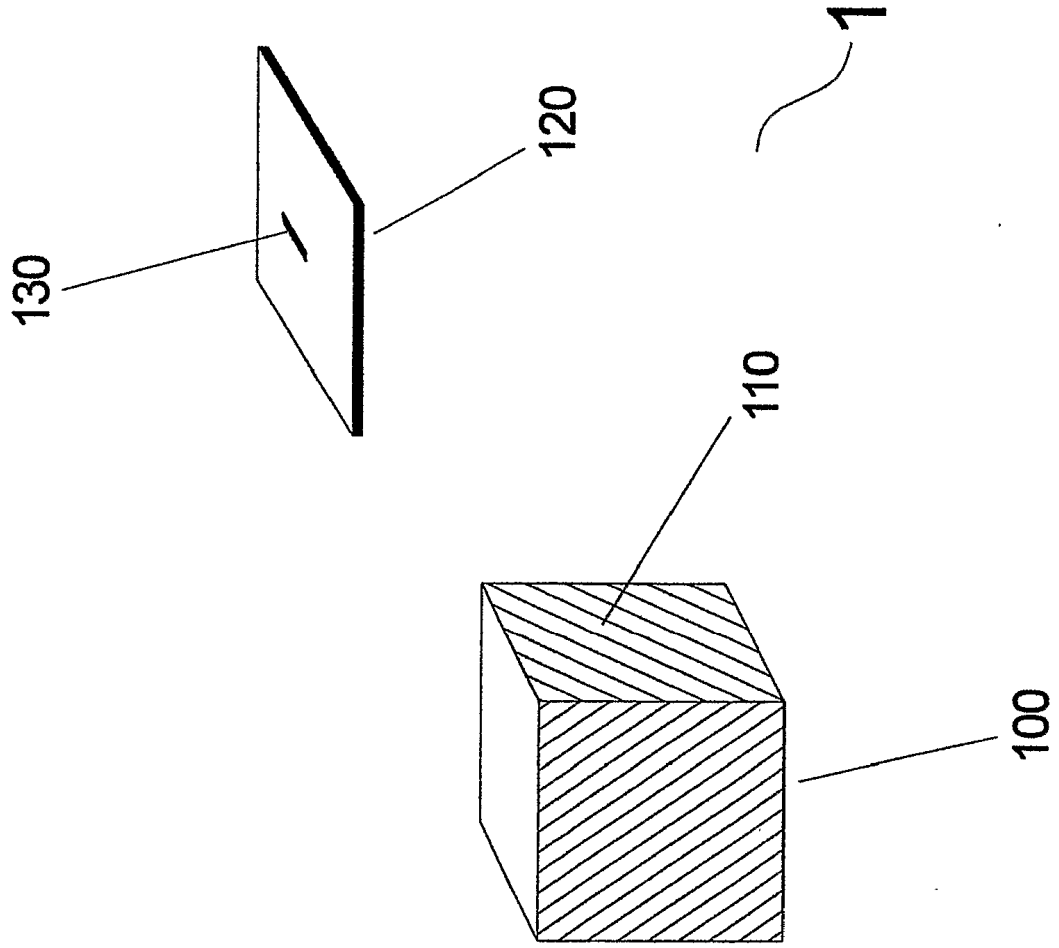


Figura 1

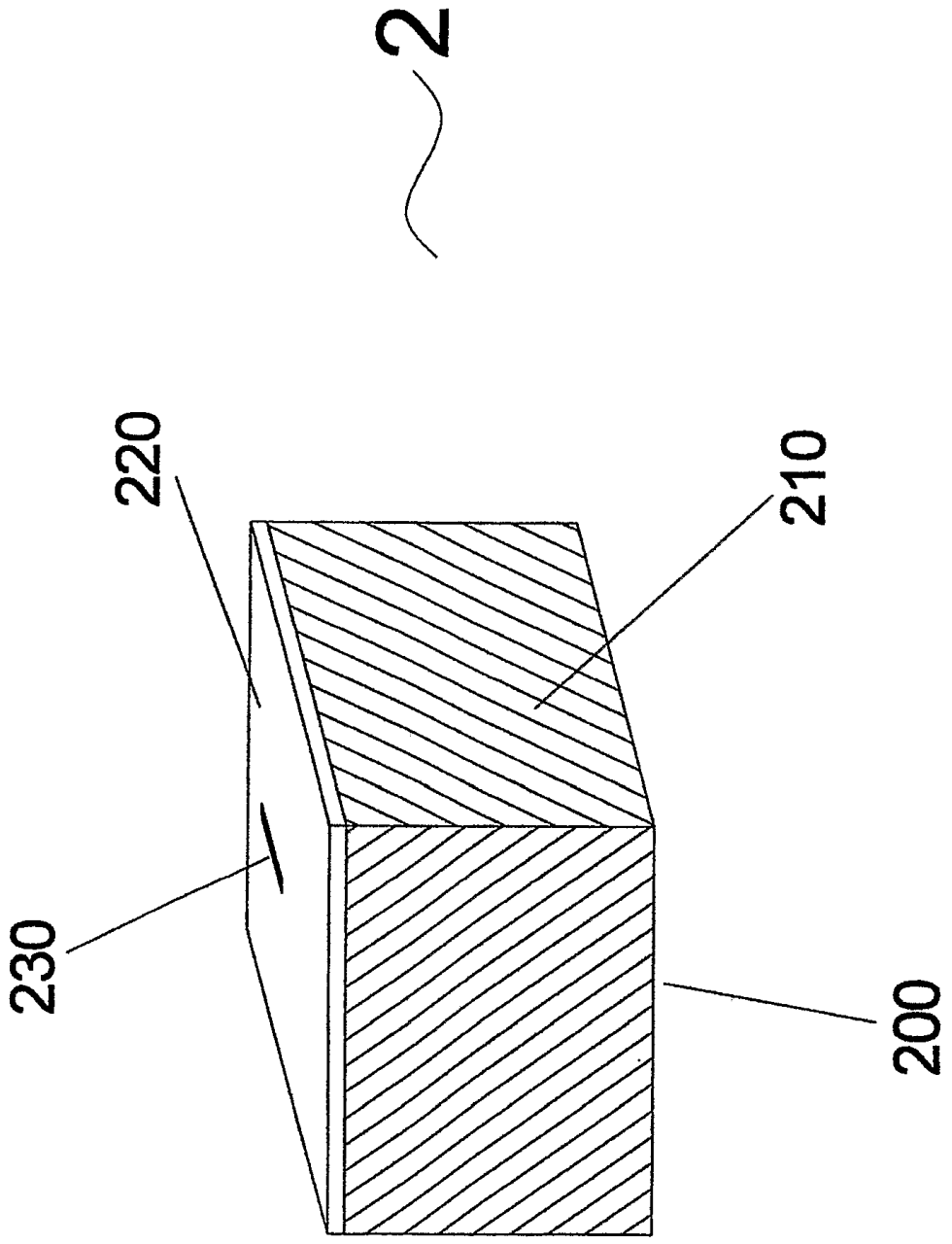


Figura 2

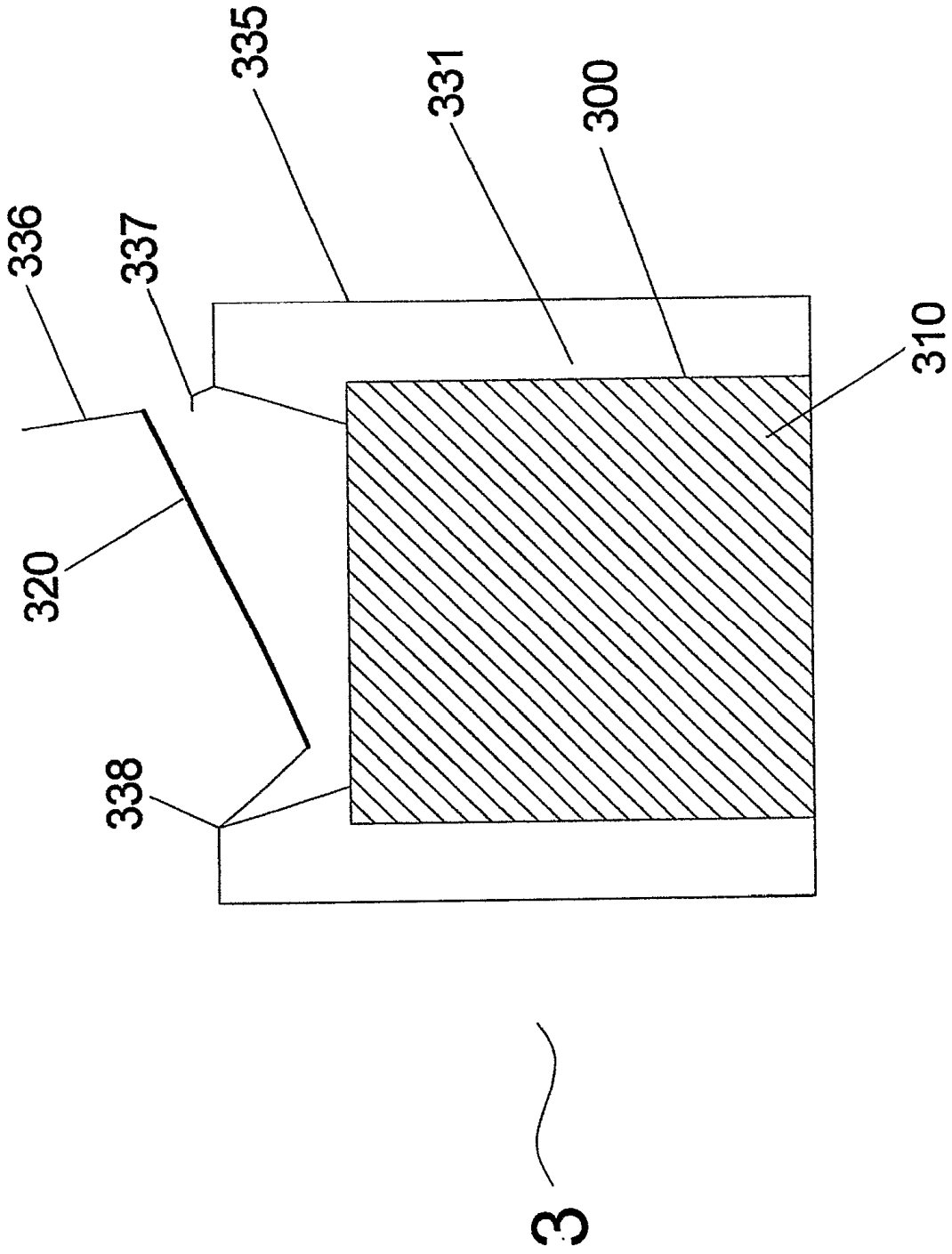


Figura 3

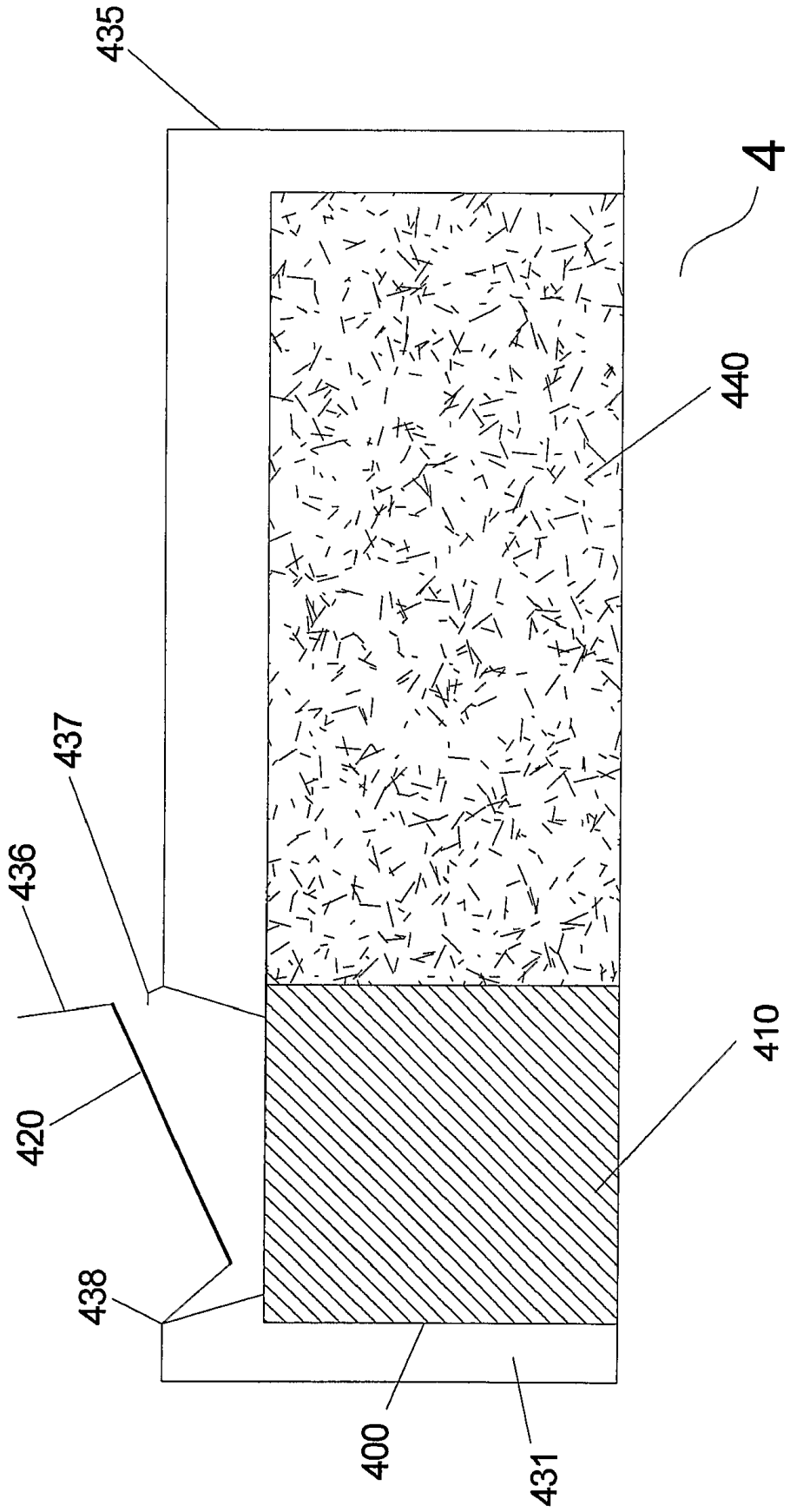


Figura 4A

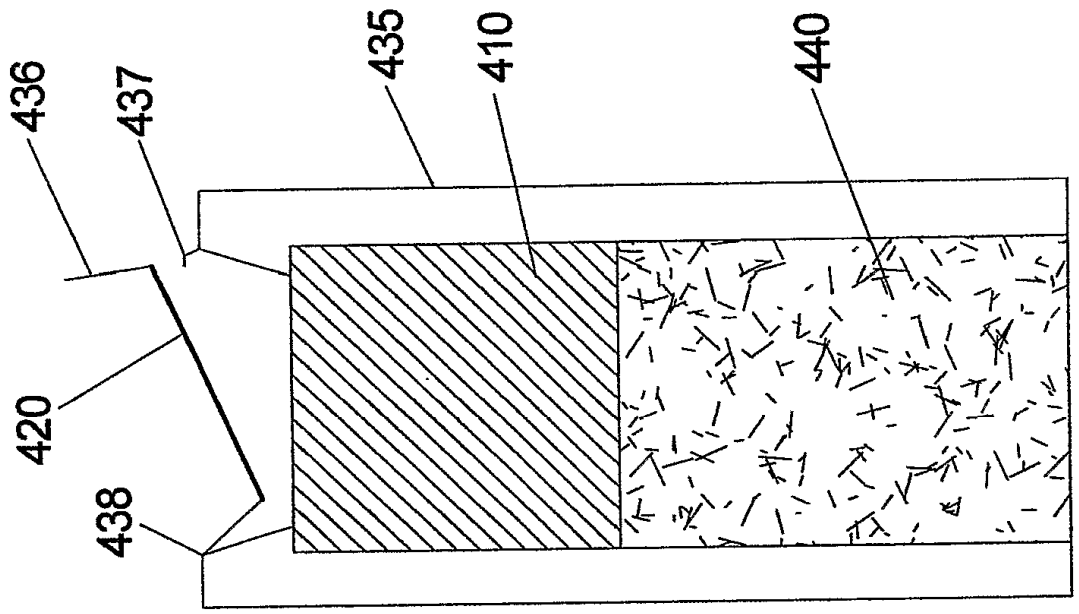


Figura 4B

4

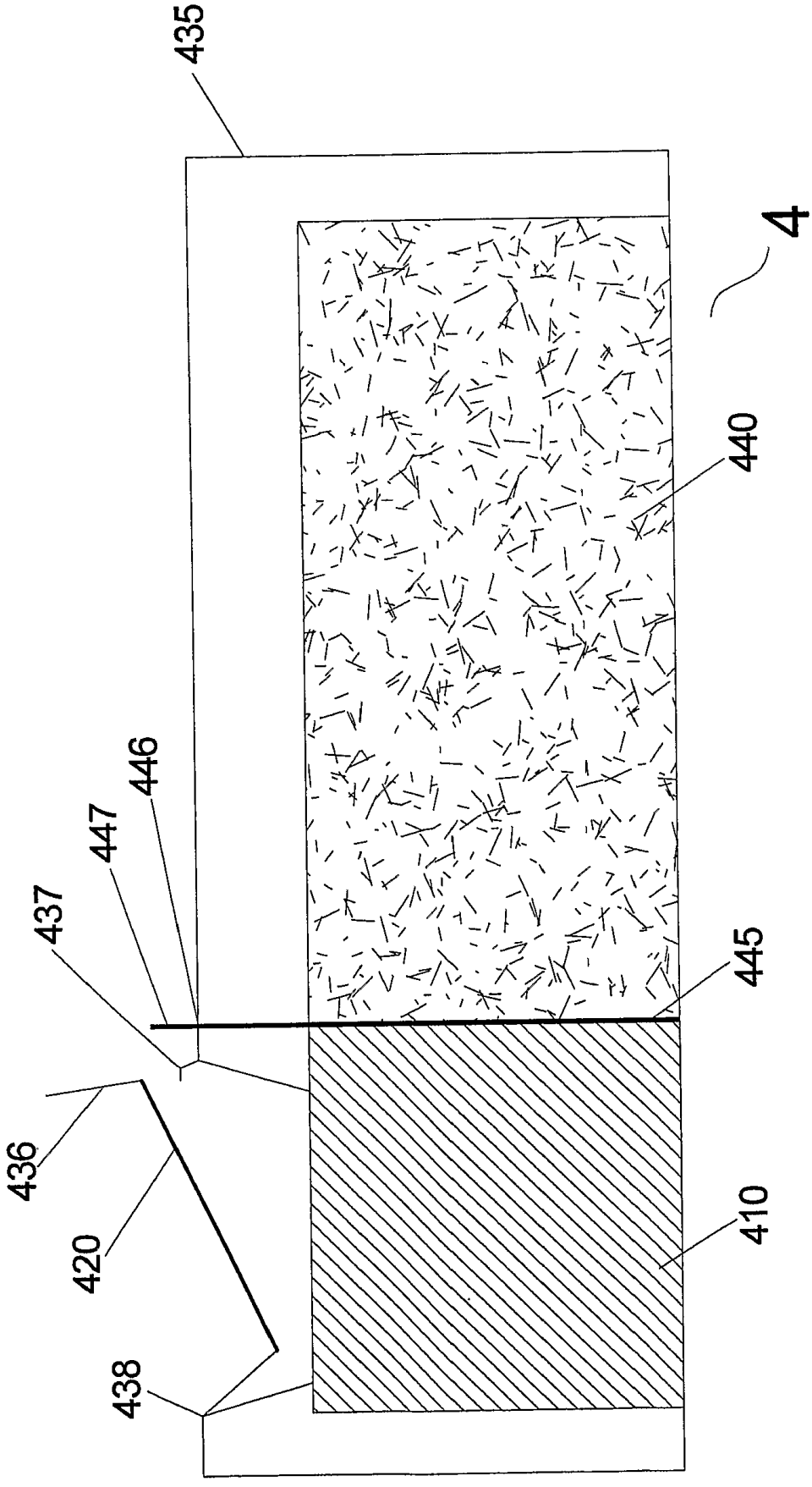


Figura 4C

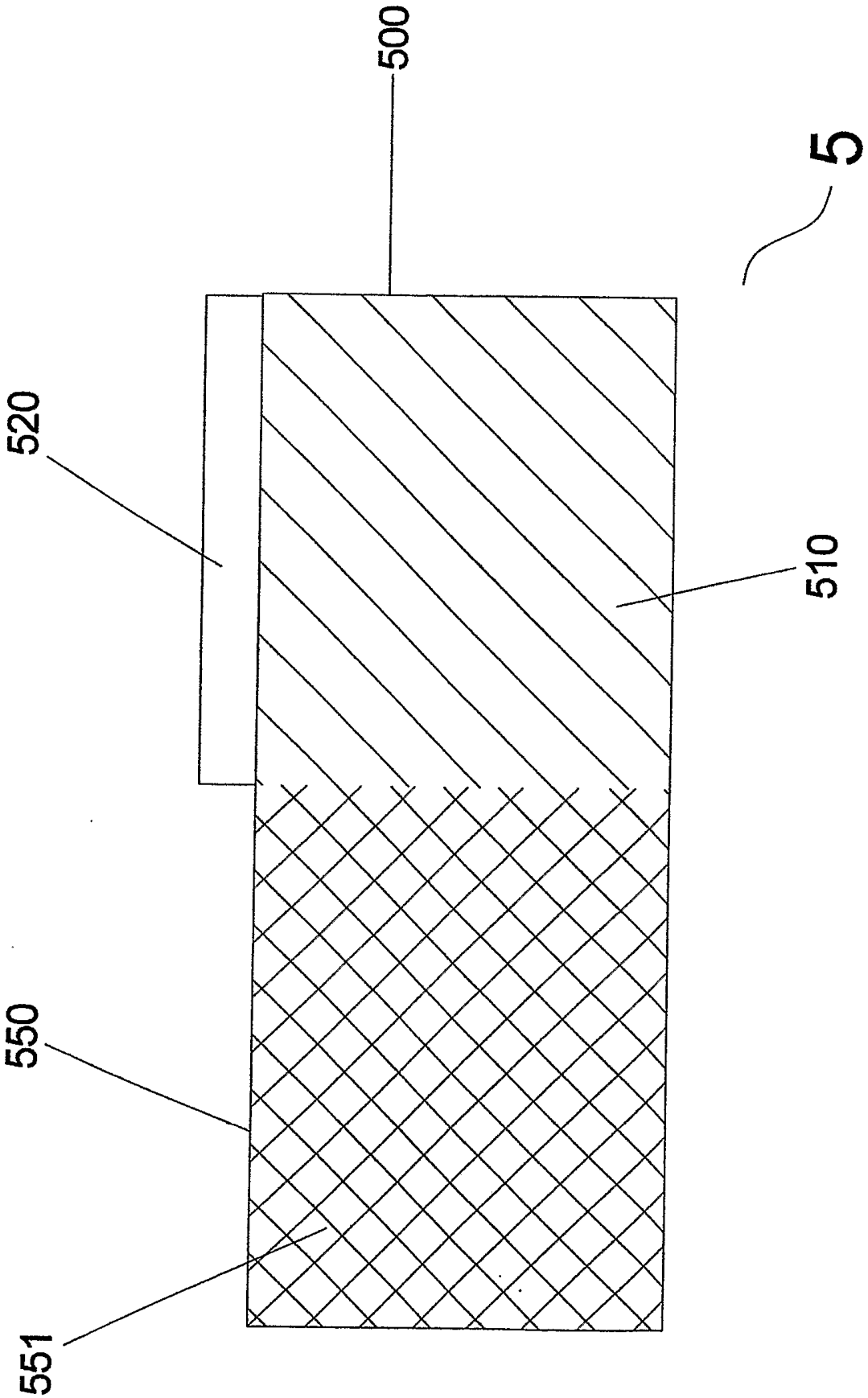


Figura 5

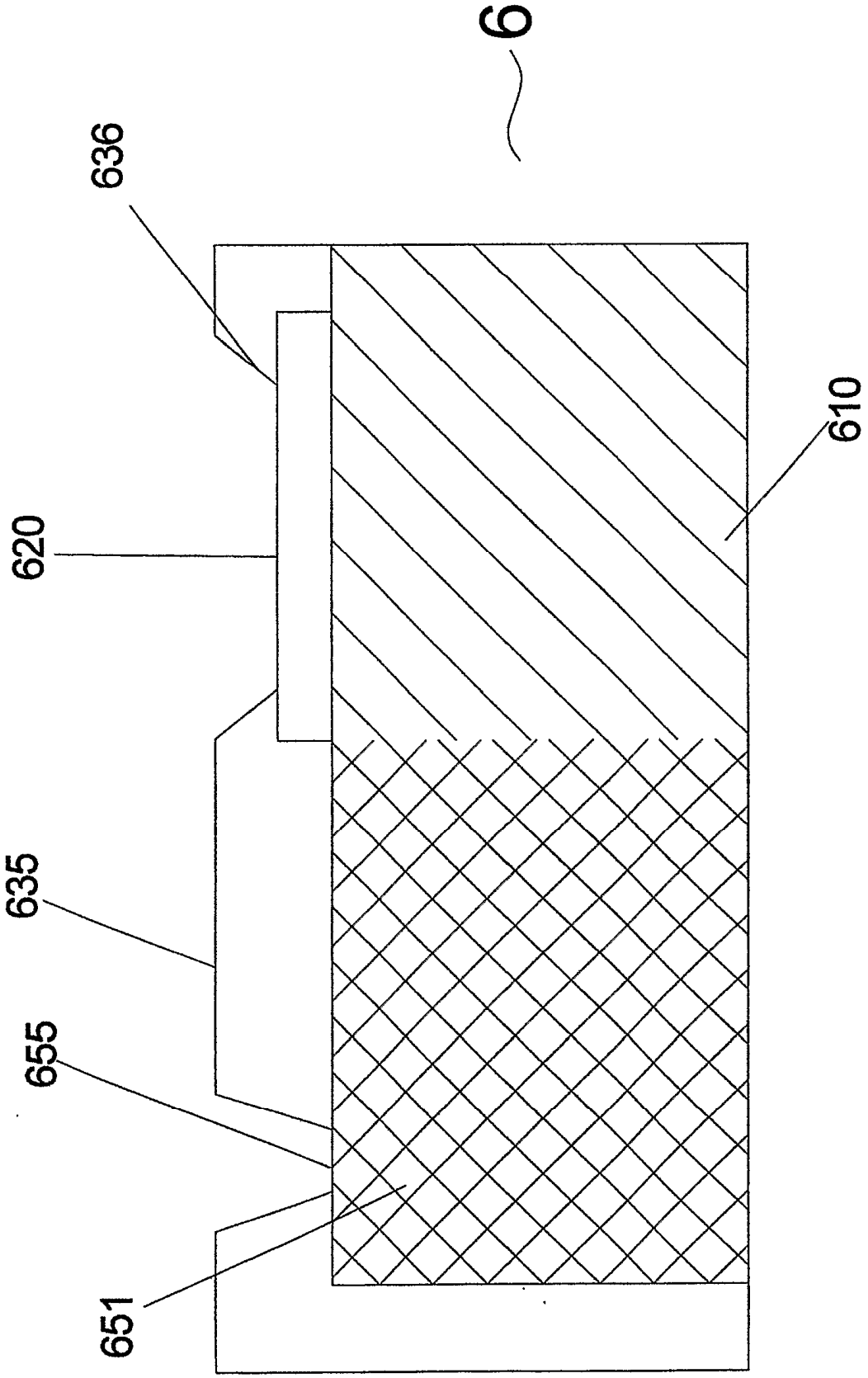


Figura 6

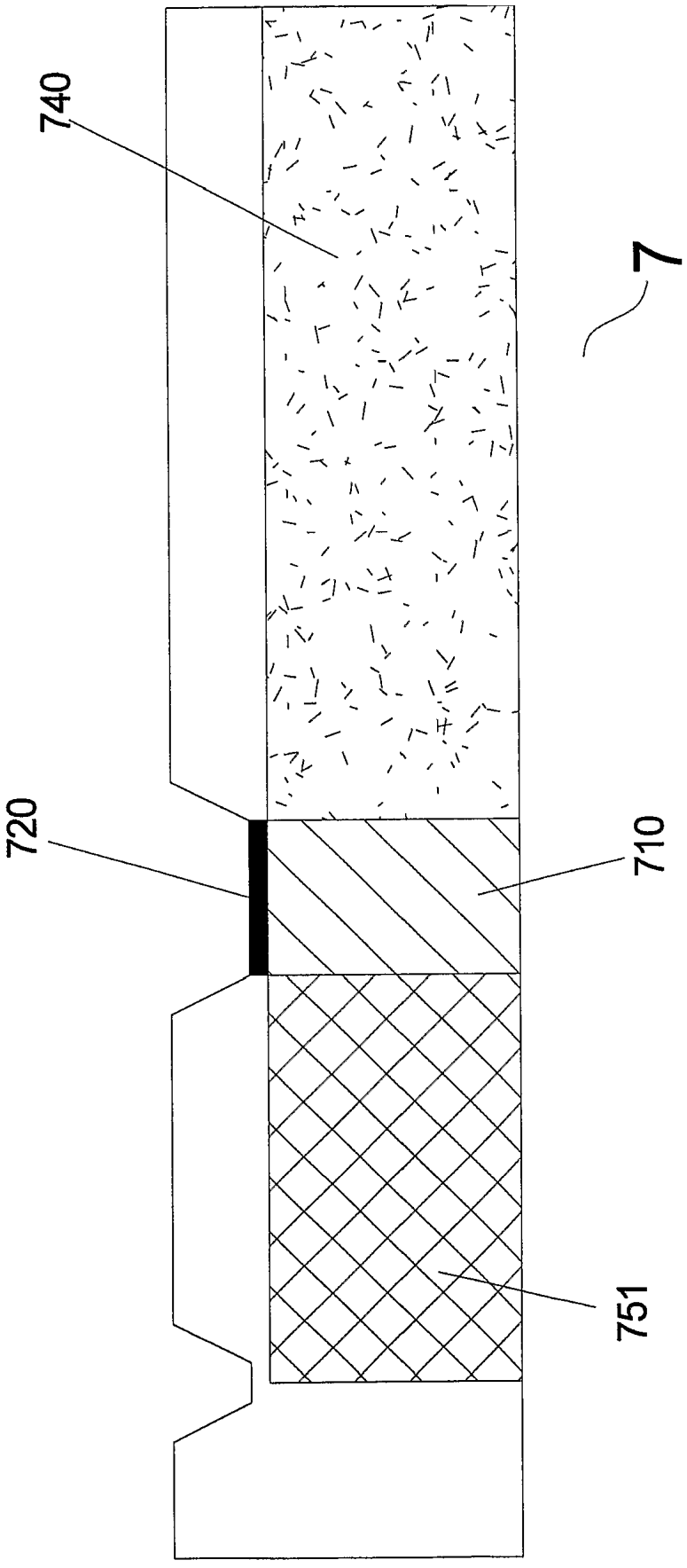


Figura 7

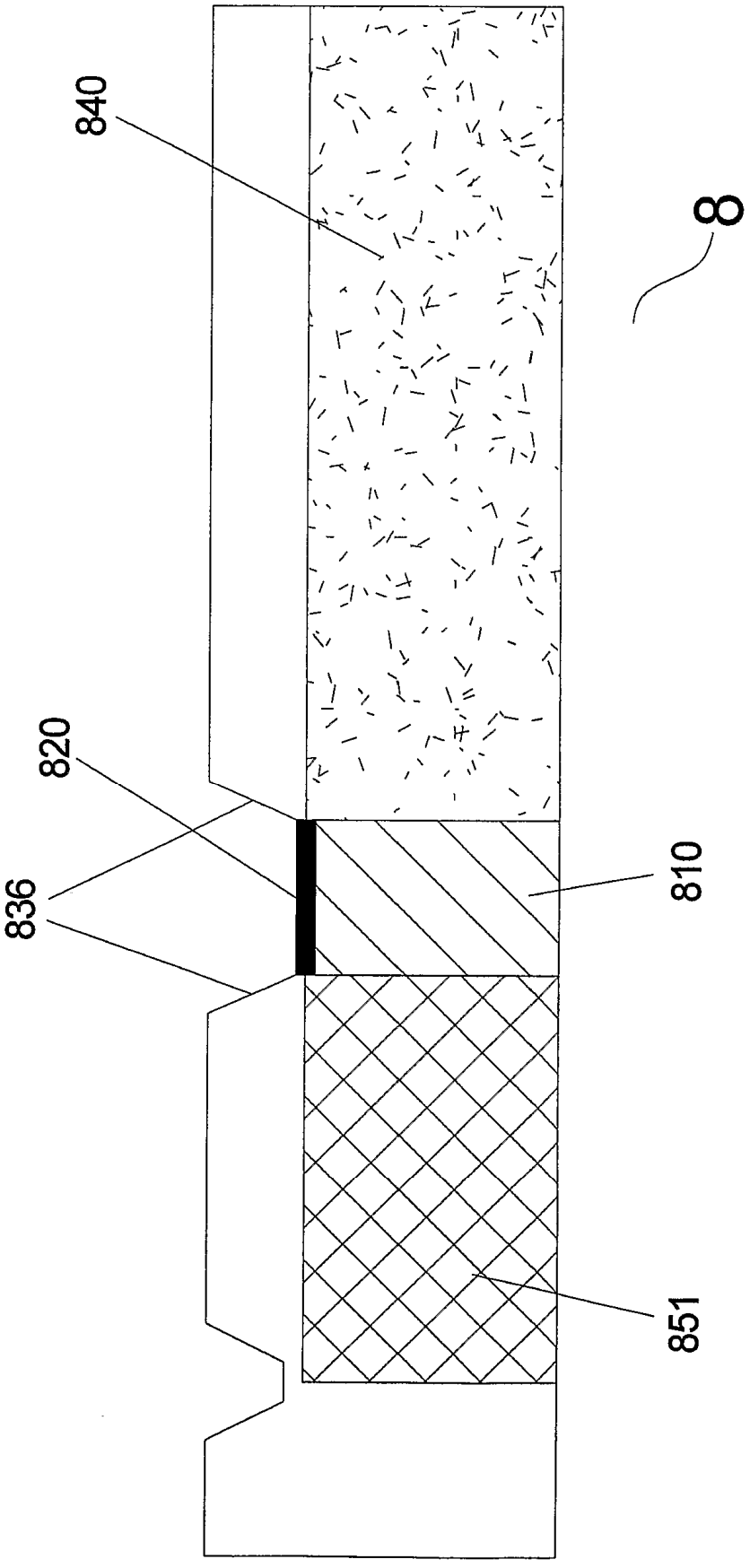


Figura 8

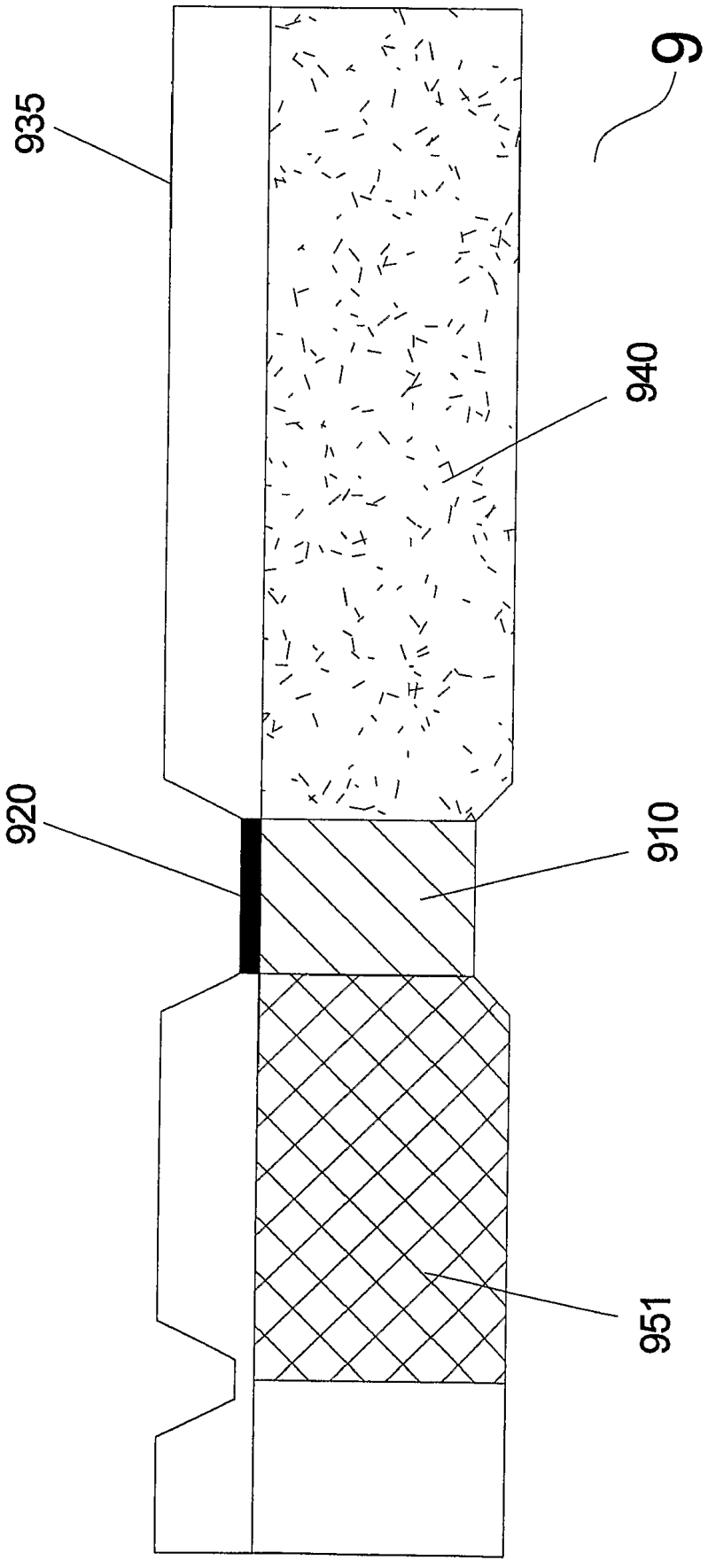


Figura 9

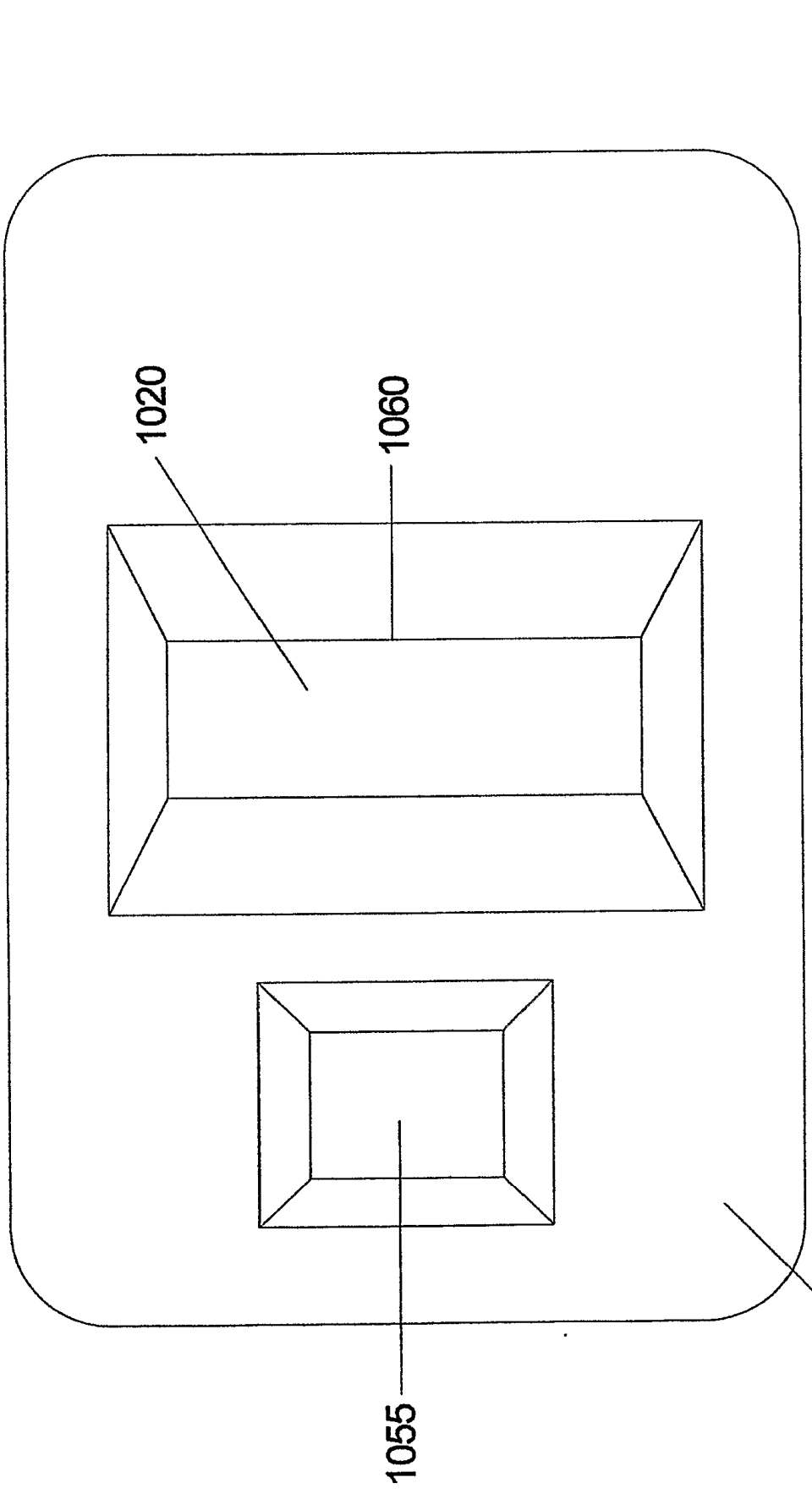


Figura 10

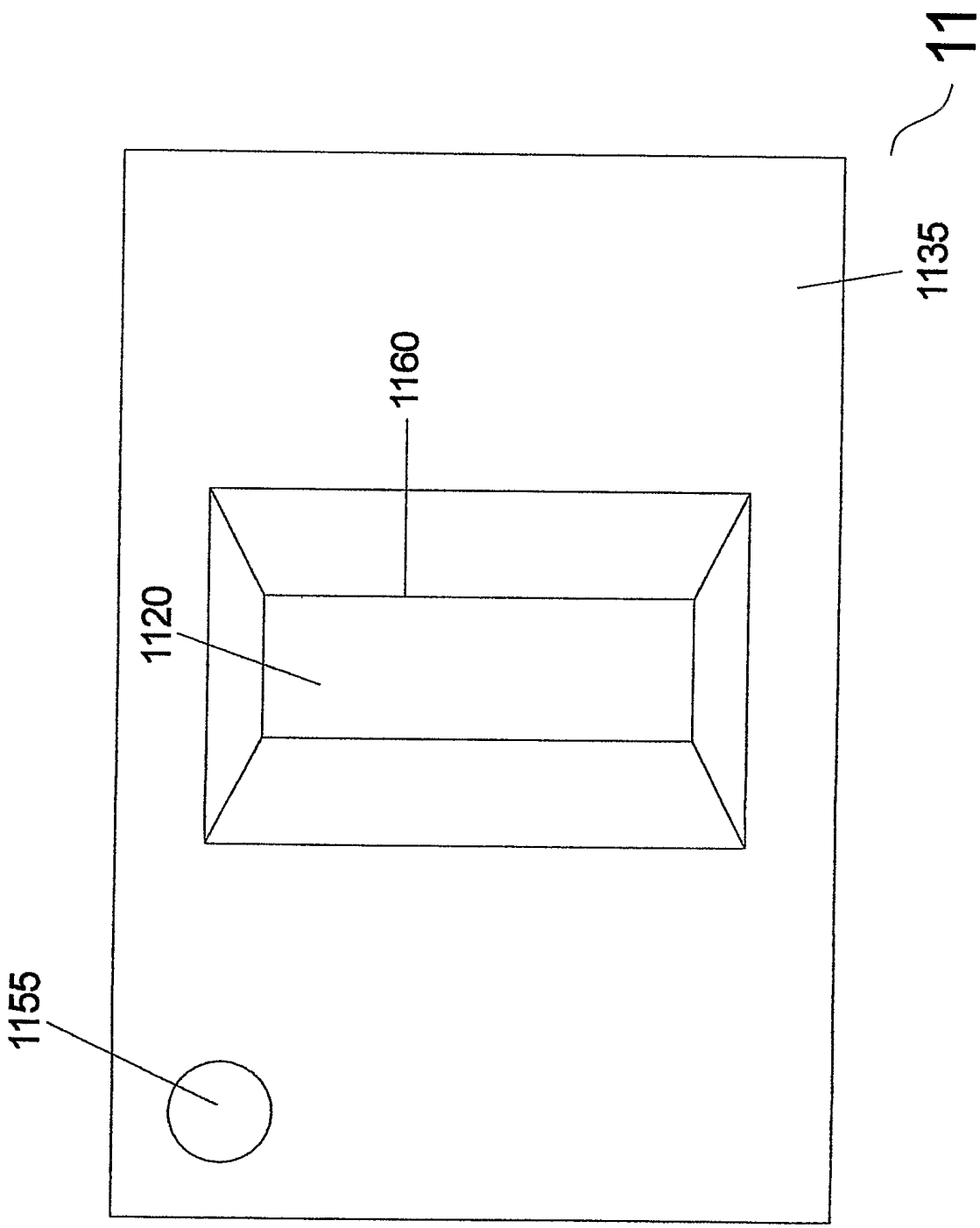


Figura 11

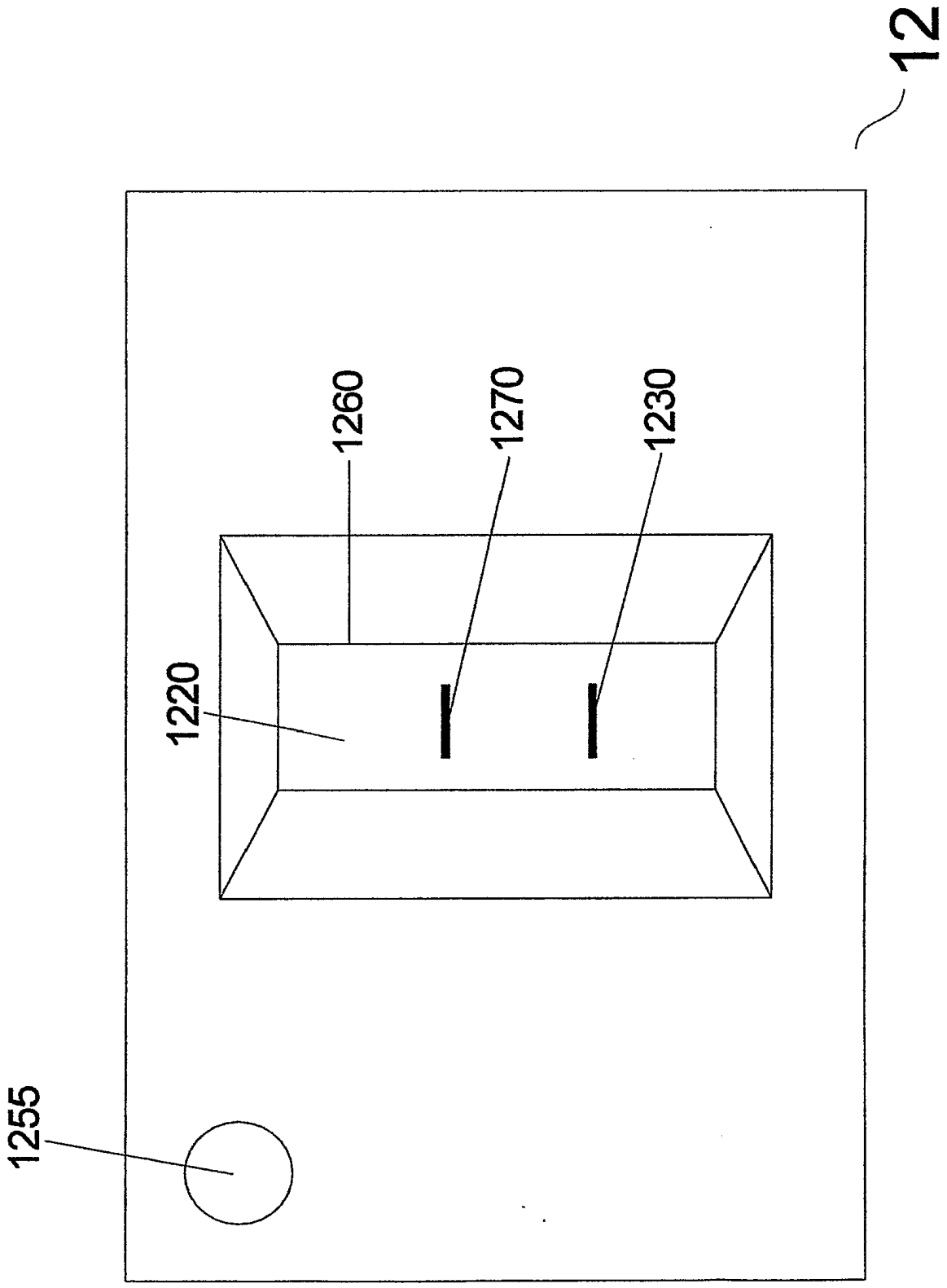


Figura 12

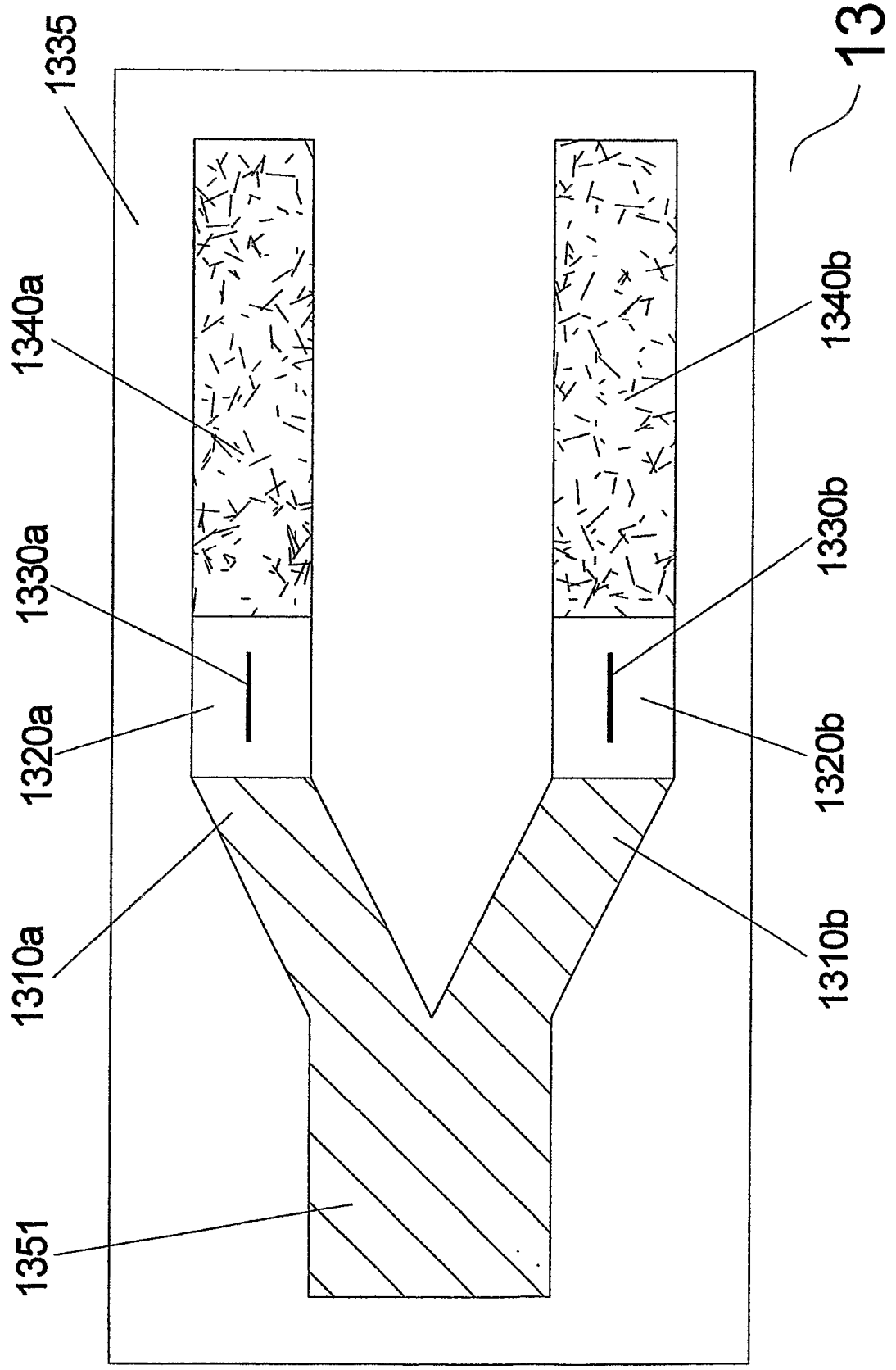

13
1335
1340a
1340b
1330a
1330b
1320a
1320b
1310a
1310b
1351

Figura 13

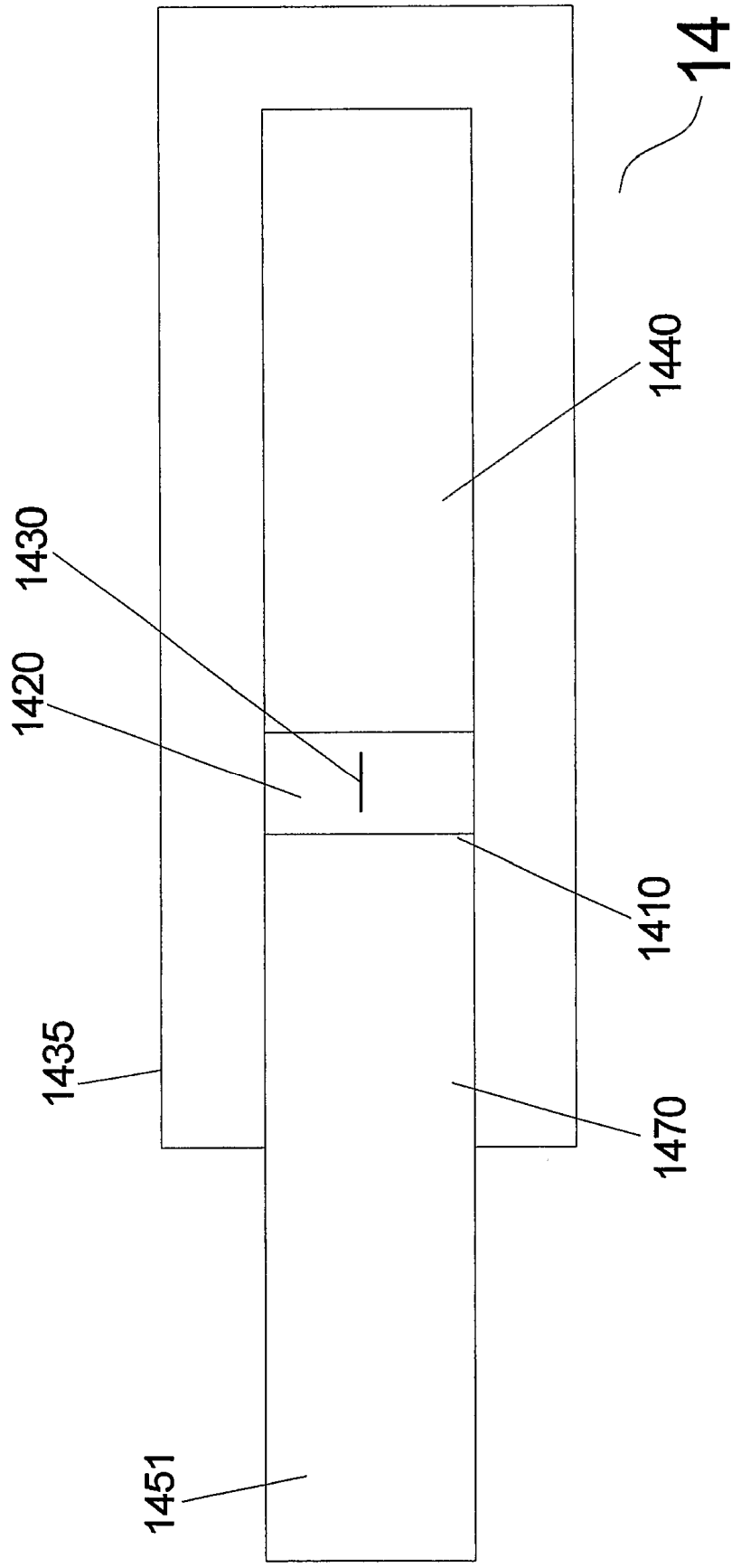


Figura 14A

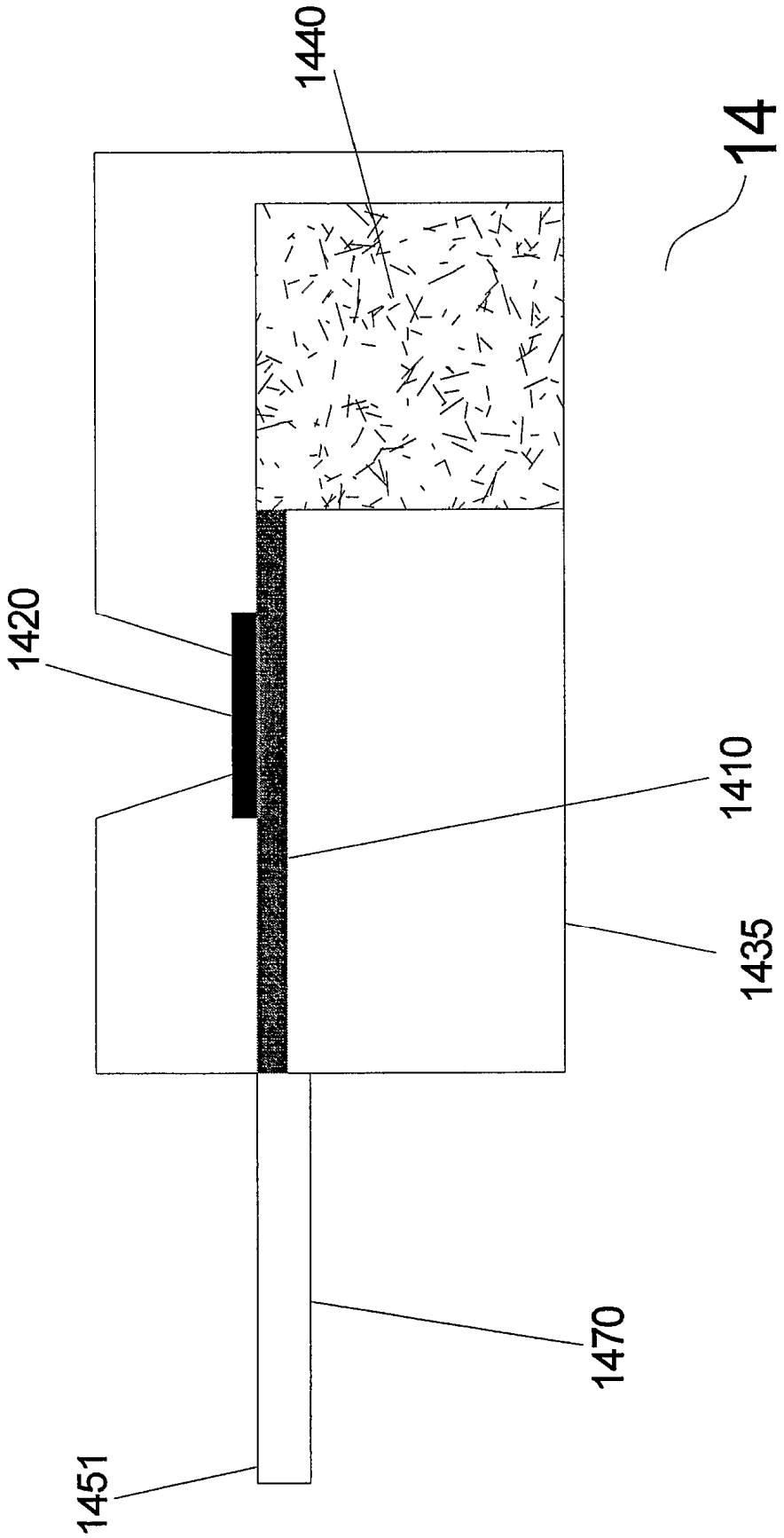


Figura 14B

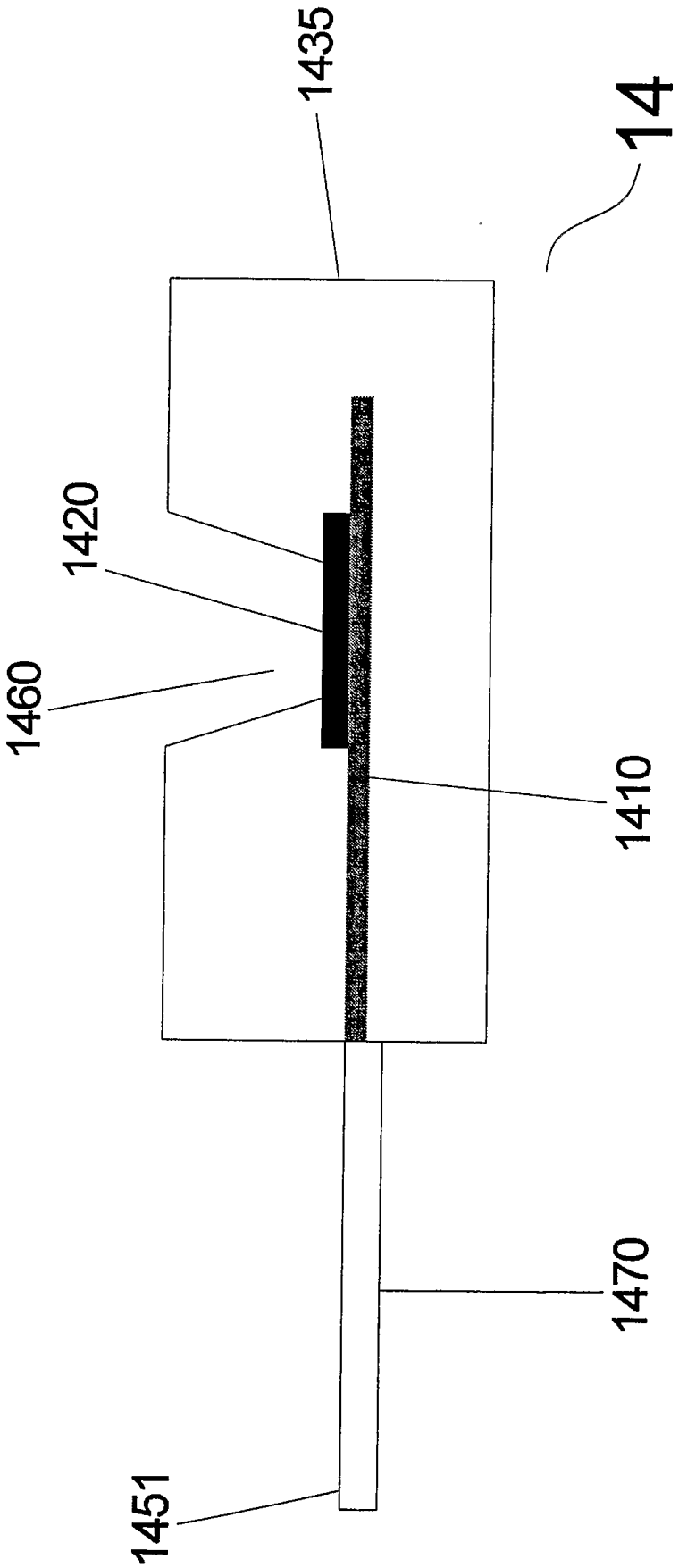


Figura 14C

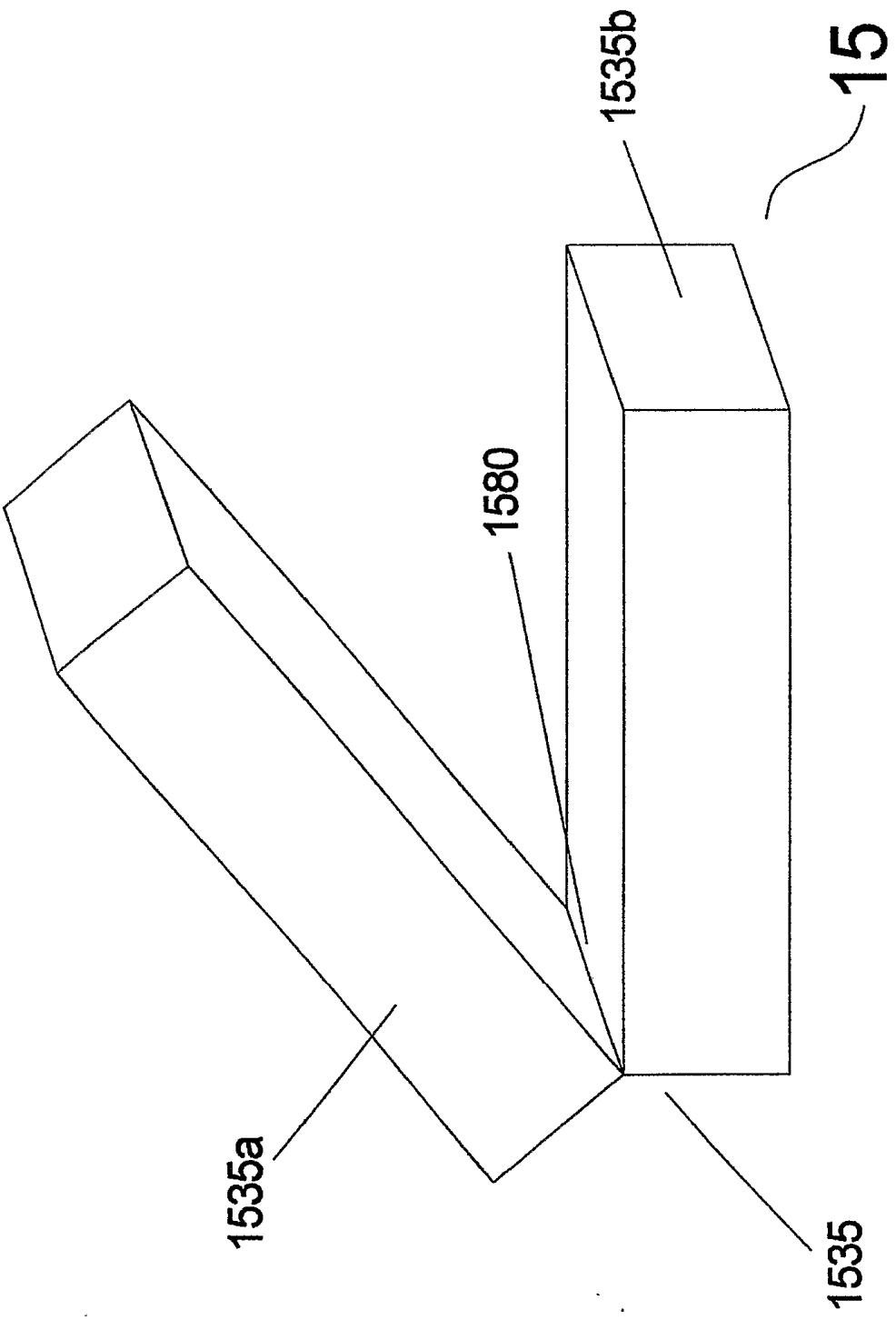


Figura 15A

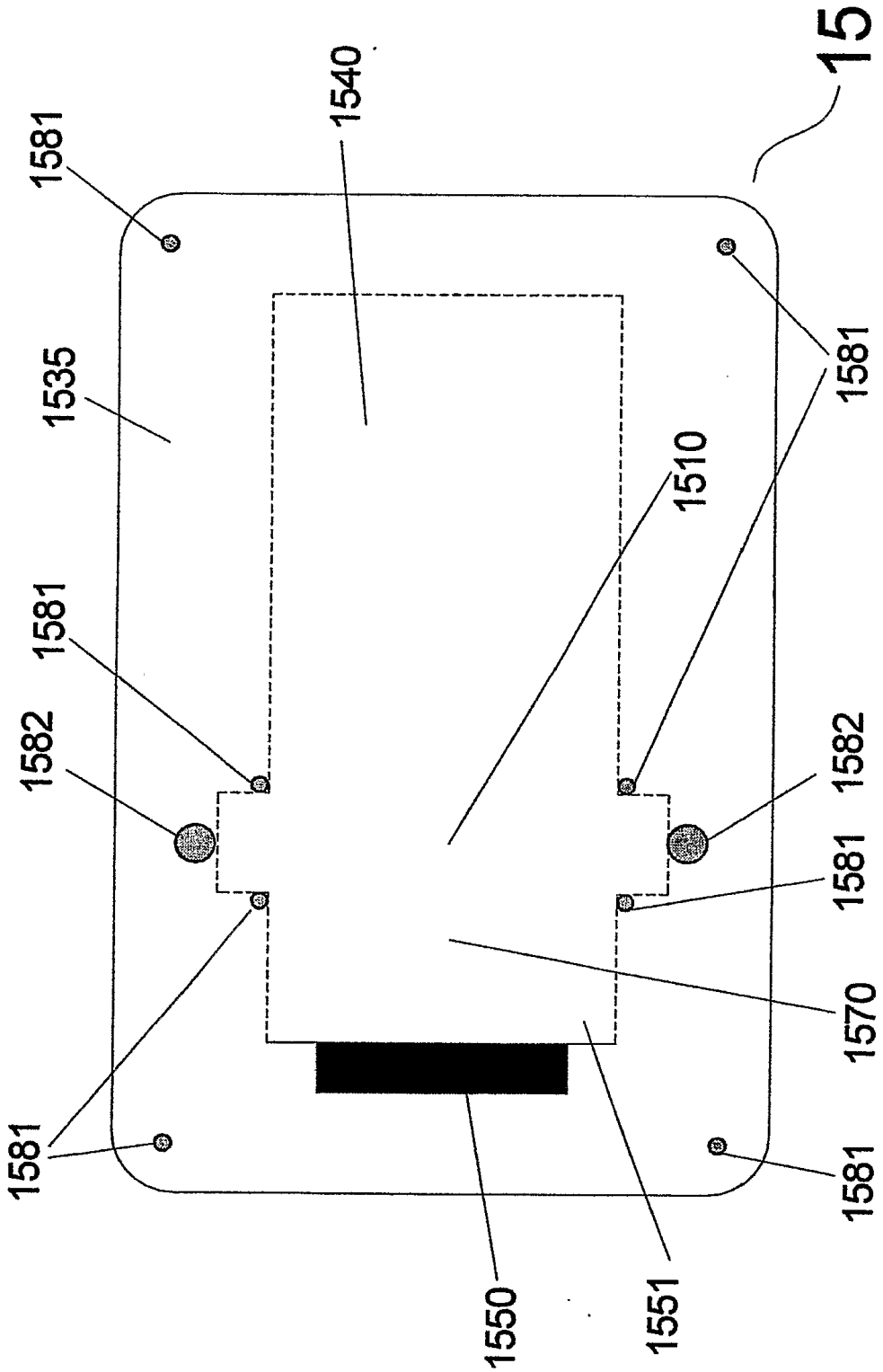

15
1540
1581
1535
1581
1510
1581
1582
1582
1581
1570
1581
1581
1550
1551

Figura 15B

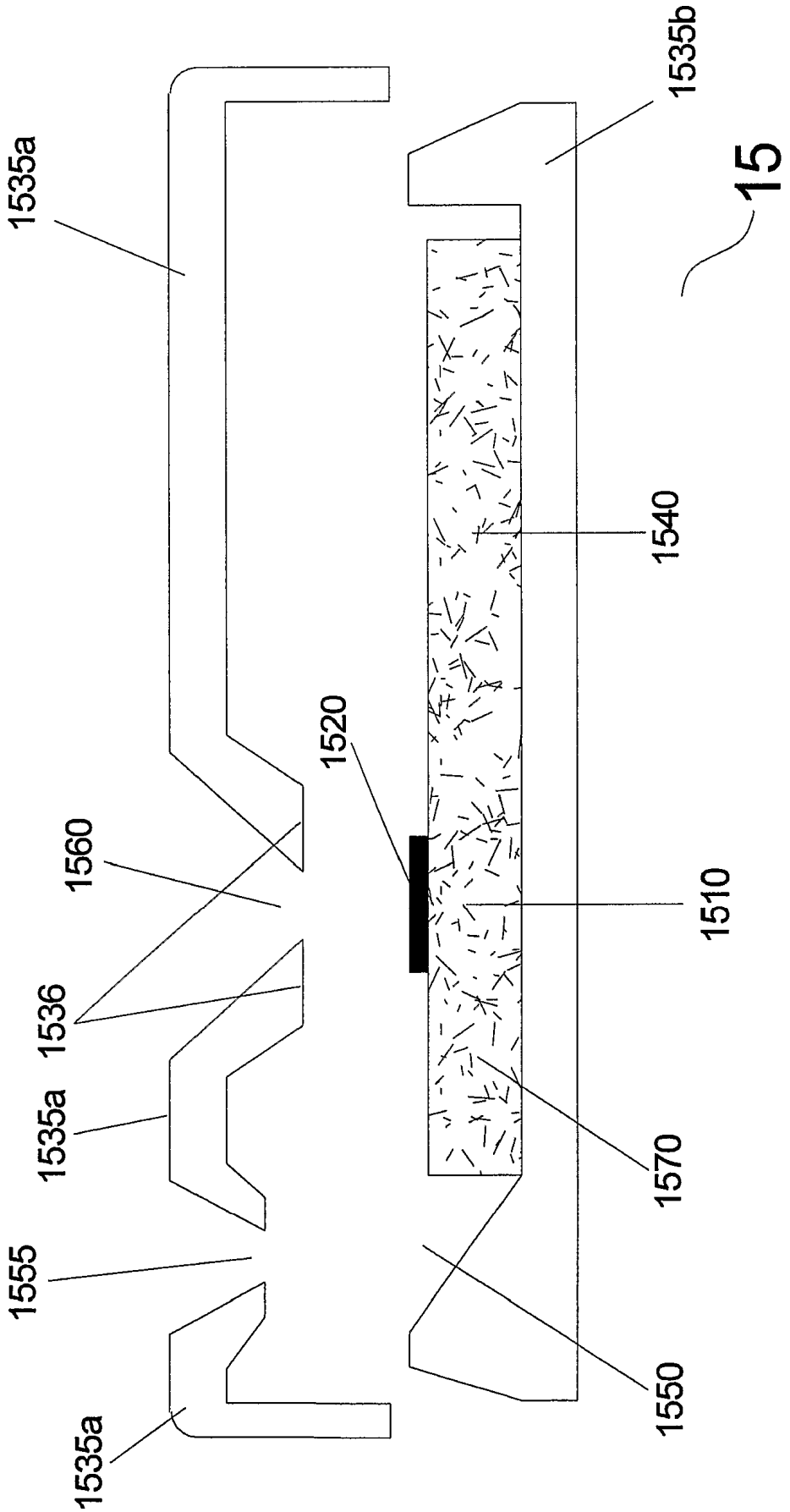

1535a
1535b
15
1540
1520
1560
1510
1536
1535a
1570
1555
1550
1535a

Figura 15C

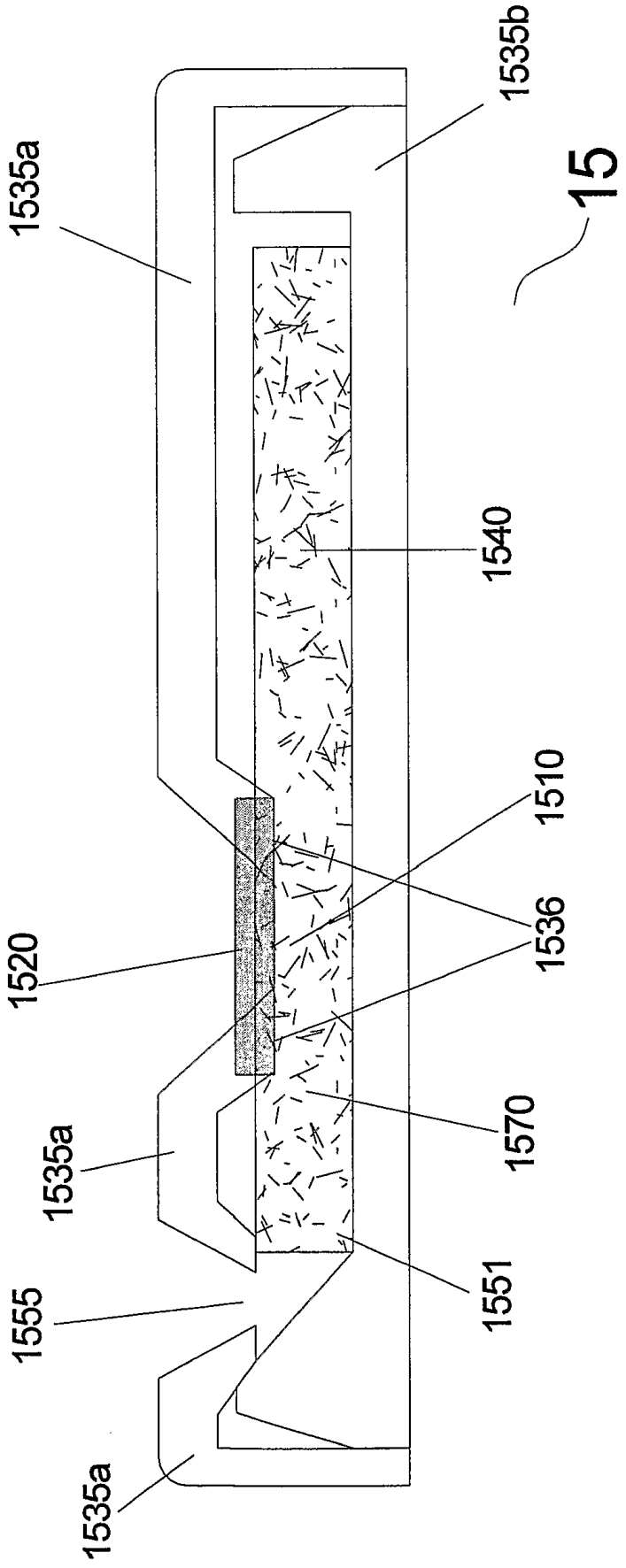

1535b
15
1535a
1540
1510
1536
1520
1570
1535a
1551
1555
1535a

Figura 15D

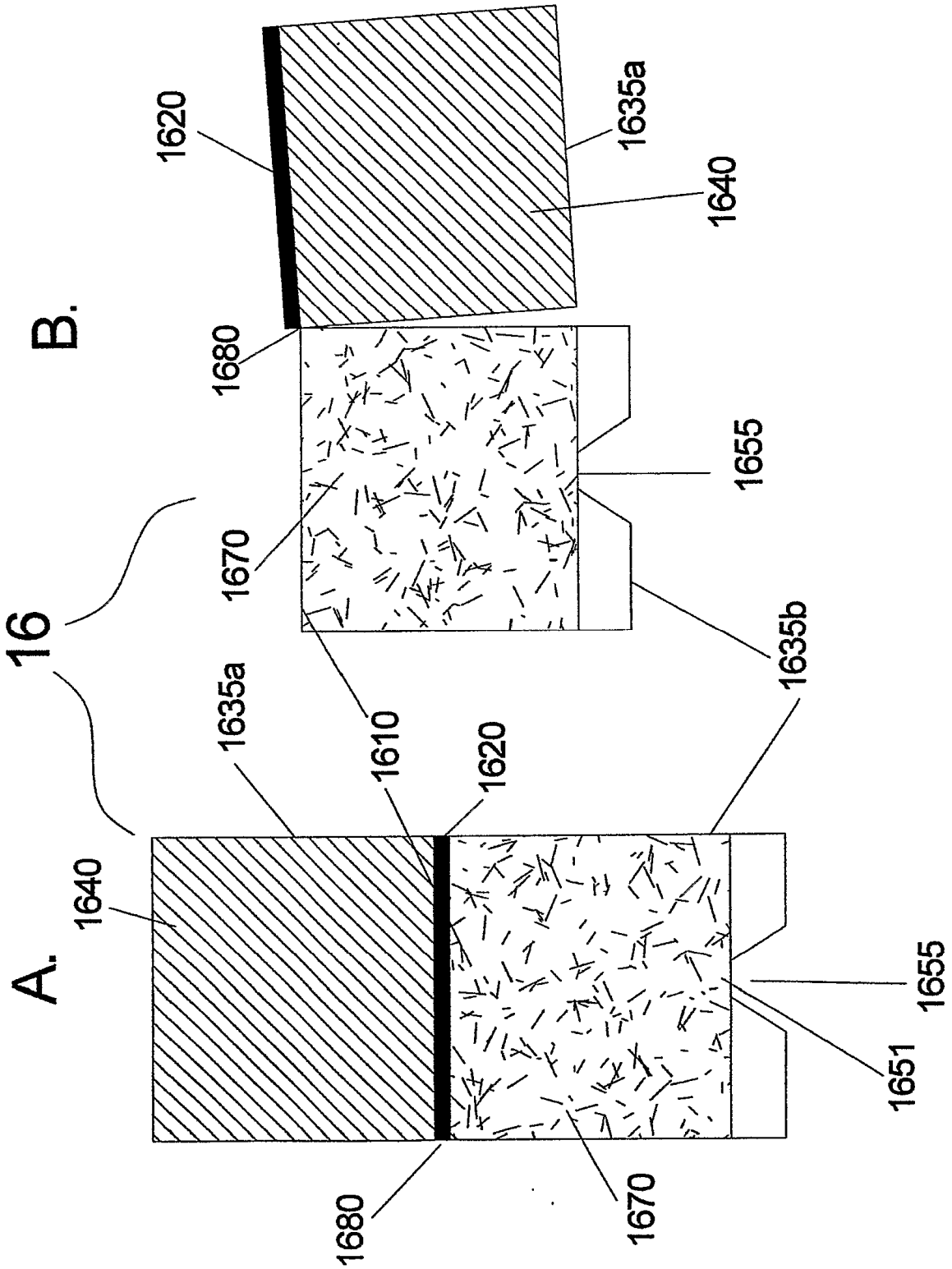


Figura 16

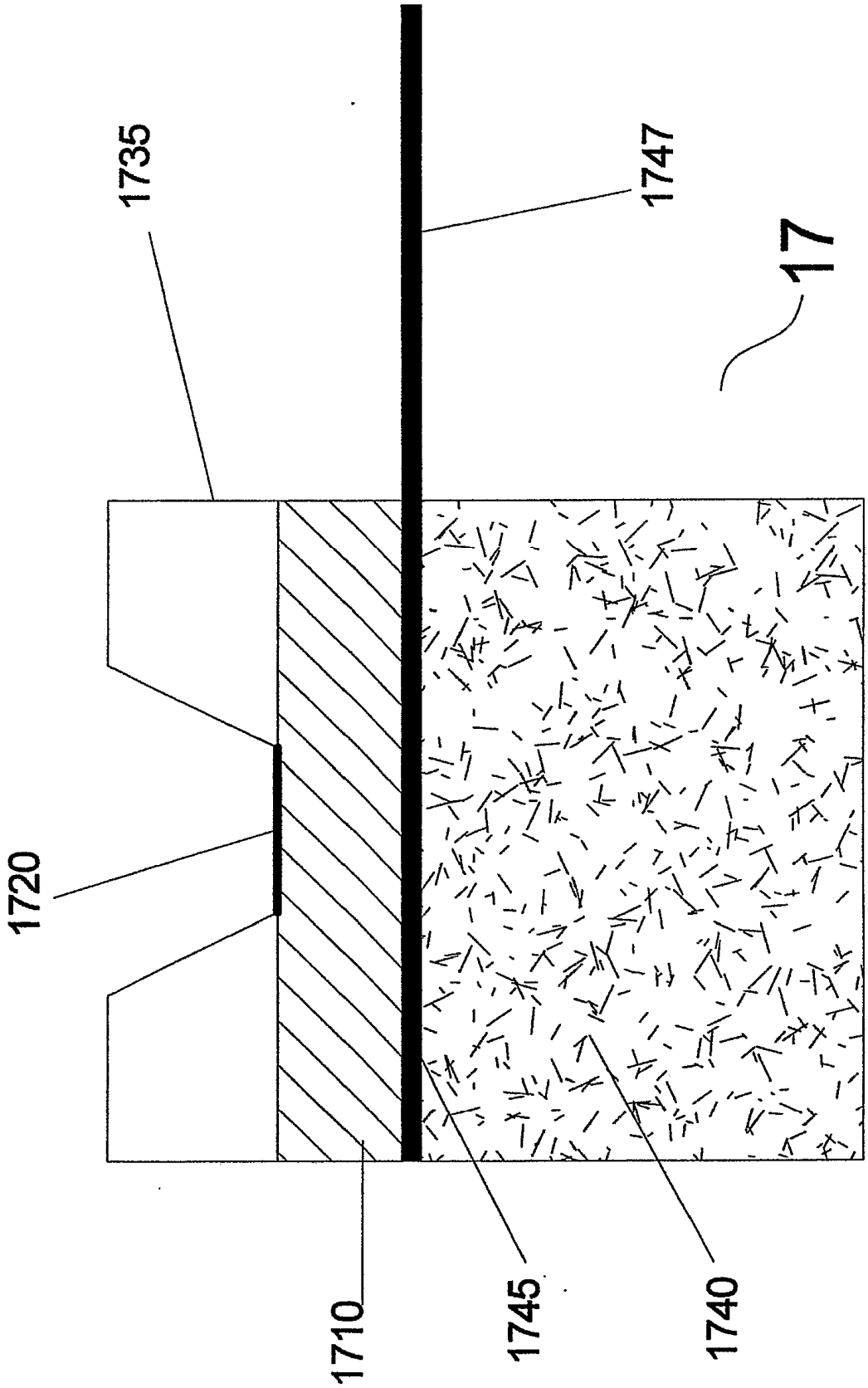


Figura 17

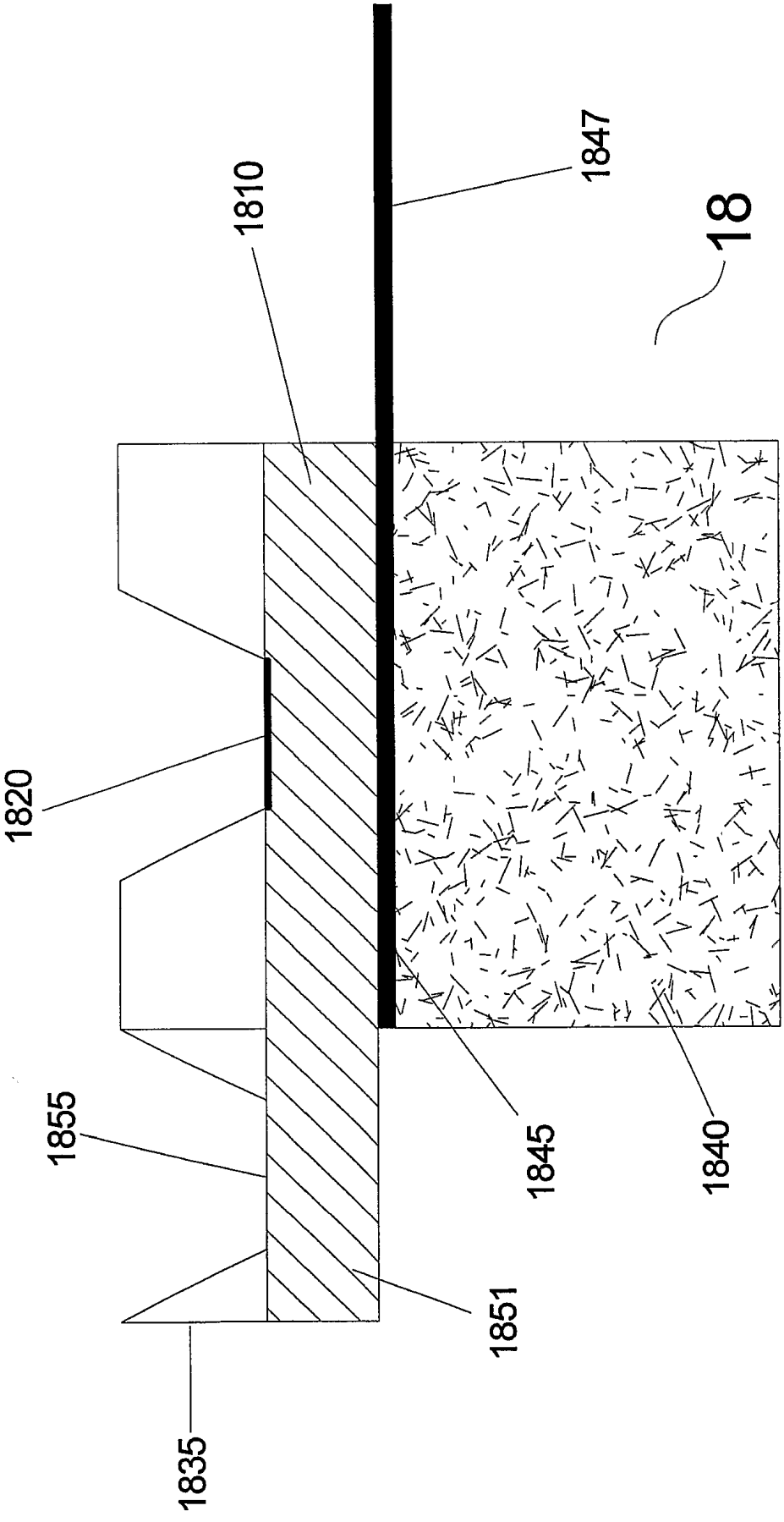


Figura 18

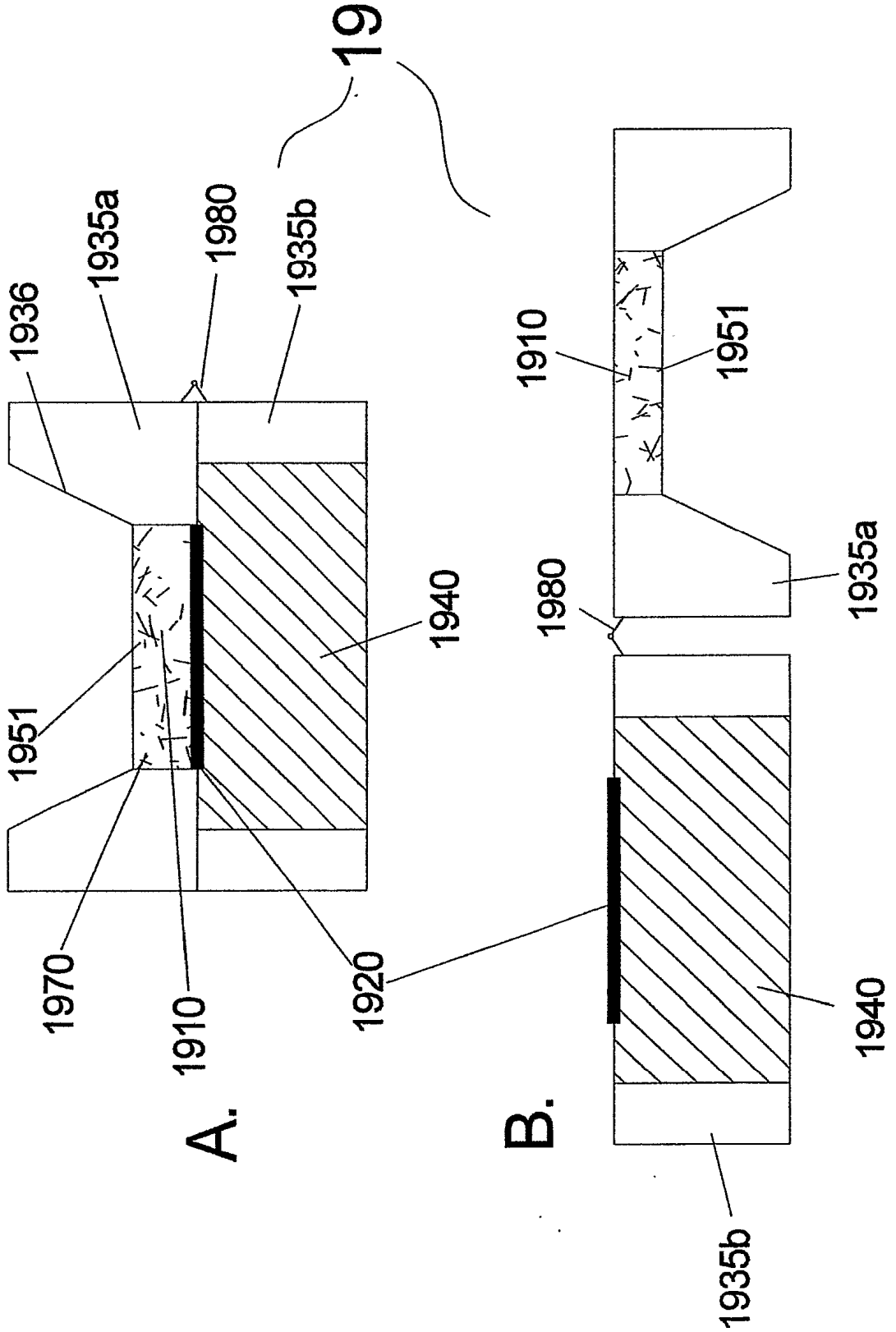

19
1936
1935a
1980
1935b
1940
1951
1970
1910
1920
A.
1910
1951
1980
1935a
1940
1935b
B.

Figura 19

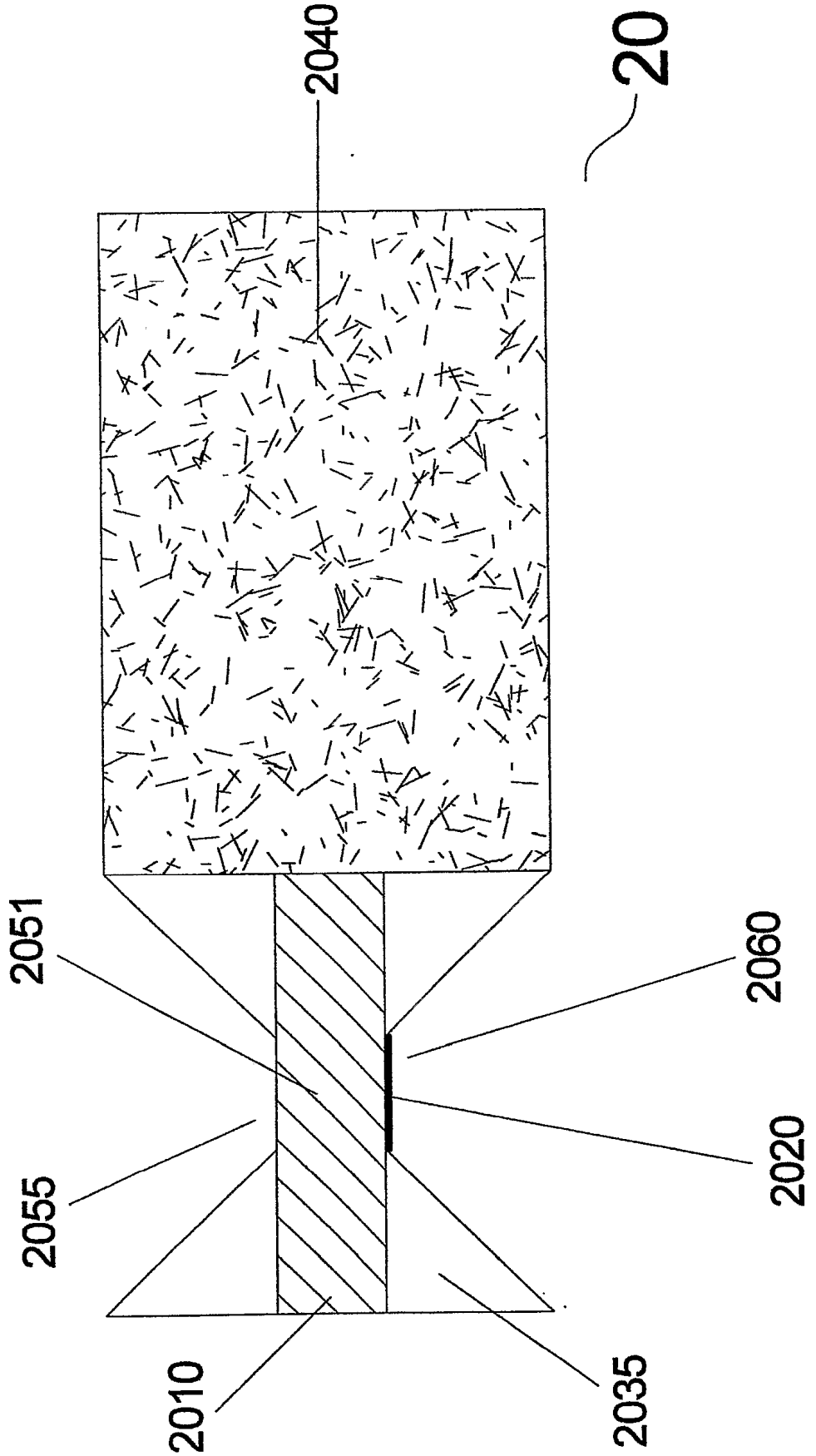


Figura 20

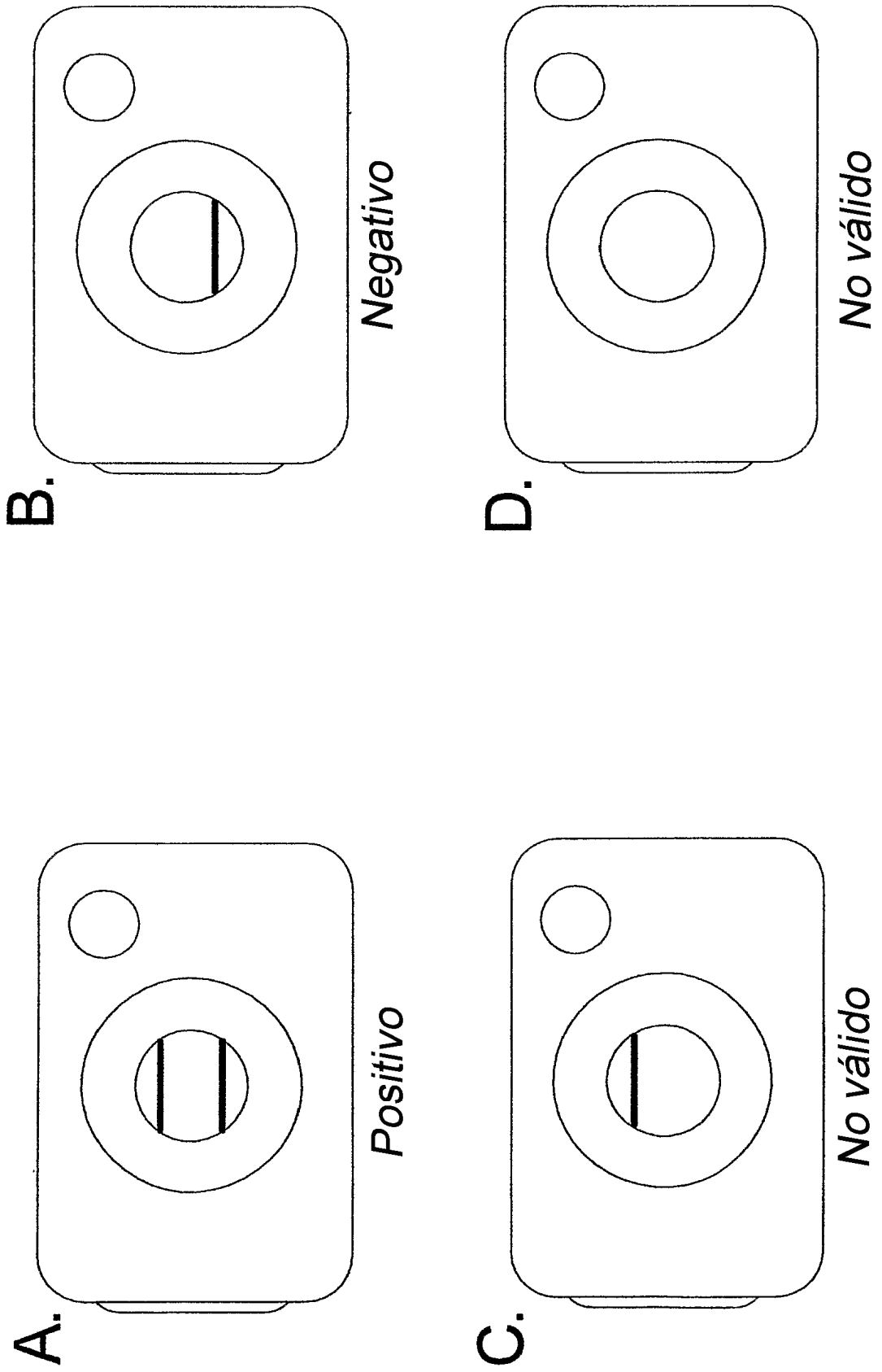


Figura 21