

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 061**

51 Int. Cl.:

G01N 21/84 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2013 E 17204410 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3321666**

54 Título: **Ensayo y lector de contraste térmico**

30 Prioridad:

31.01.2012 US 201261593036 P

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

31.03.2021

73 Titular/es:

REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA (50.0%)

600 McNamara Alumni Center, 200 Oak Street SE Minneapolis, MN 55455, US y

THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO (50.0%)

72 Inventor/es:

BISCHOF, JOHN C.;

QIN, ZHENPENG;

CHAN, WARREN y

AKKIN, TANER

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 816 061 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo y lector de contraste térmico

Campo

5 La presente invención se refiere a ensayos y lectores para detectar analitos en una muestra. Más específicamente, la presente invención se refiere a ensayos y a lectores que funcionan basándose en el contraste térmico.

Antecedentes

10 La tecnología LFA (ensayo de flujo lateral, o inmunoensayo de flujo lateral, también llamado ensayo de diagnóstico rápido – RDT, o bioensayos) se utiliza ampliamente tanto en y fuera del entorno de laboratorio. En un ensayo típico, una muestra de un fluido de un paciente se aplica a una tira de ensayo. La muestra interactúa con productos químicos de la tira de ensayo haciendo que la tira cambie sus características ópticas. El indicador visual puede observarse por una persona, por ejemplo, utilizando un ensayo de gestación en su casa. Sin embargo se pueden obtener lecturas más precisas utilizando un lector de ensayos. Dicho lector puede, por ejemplo, incluir un sensor óptico sensible que es capaz de detectar variaciones ópticas más precisamente y en una manera más reproducible que un observador humano. Un ejemplo de un lector de ensayo típico se muestra en la Patente de EE. UU. N° 7.297.529, de Polito y col., expedida el 20 de noviembre de 2007.

15 La capacidad para identificar enfermedades rápidamente hace posible el tratamiento rápido y mejora los resultados. Esta posibilidad ha aumentado el desarrollo y uso de dispositivos rápidos en el punto de atención o sistemas que son capaces de la detección biomolecular de entornos con muchas visitas y recursos limitados. Los LFA son baratos, simples, portátiles y robustos, haciendo que el uso de los LFA sean comunes en medicina, agricultura, y del personal de recepción, tal como el ensayo de gestación. Los LFA también se utilizan ampliamente para varias enfermedades infecciosas, tal como malaria, criptococosis asociada al SIDA, meningitis, neumonía neumocócica, y recientemente tuberculosis.

20 Aunque la actuación analítica de algunos LFA es comparable a los procedimientos basados en laboratorio, la sensibilidad analítica (llamada alternativamente límite de detección) de la mayoría de LFA está en el intervalo de mM a μ M, que es significativamente menos sensible que otras técnicas moleculares tales como los inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA). Como consecuencia, los LFA no son particularmente útiles para la detección precoz en el curso de una enfermedad cuando hay un bajo nivel de antígeno. La investigación se ha enfocado en el desarrollo de microfluidica, biocódigos de barras y tecnología de ensayos basados en enzimas para obtener mayor sensibilidad en la detección de antígenos ya que estas técnicas pueden detectar potencialmente en intervalos de nM a pM. Sin embargo, todos estos procedimientos aún están es estado de desarrollo y no han demostrado que sirven para su adopción de una manera fiable, de bajo coste para su uso en un sitio de atención primaria por un usuario final.

25 Como se sabe bien ahora, las propiedades térmicas y eléctricas de los materiales cambian drásticamente a nanoescala. En particular, se ha utilizado el aumento de señal fototérmica de nanopartículas de metal para: ablación térmica de tumores malignos, detección de células tumorales circulantes, transfección fototérmica genética, aumento de eficacia terapéutica de quimioterápicos, y para el seguimiento del transporte de nanopartículas en las células. El documento WO 00/31539 A1 describe un procedimiento para realizar un ensayo de flujo lateral en el que se deposita una muestra en una tira reactiva en una región de aplicación, se detecta una primera señal de detección que surge de la tira reactiva en una primera región de detección, y se obtiene un valor inicial para una primera zona de medición generada interpolando entre valores de la señal de detección fuera de la primera zona de medición y dentro de la primera zona de detección. El documento US 2008/032420 A1 describe ensayos multiplexados que emplean puntos cuánticos para aplicaciones que incluyen la detección de proteínas humanas y el seguimiento de microorganismos relevantes para la contaminación del agua. El documento US 2004/180369 A1 describe un ensayo de detección de hibridación nucleica que comprende nanopartículas unidas a moléculas que comprenden un miembro de un par de unión a ligando, mientras que las secuencias diana comprenden el otro miembro.

Sumario

45 Un ejemplo se refiere a un lector de un ensayo de contraste térmico. El lector de ensayo de contraste térmico incluye una fuente de energía, un sensor, un circuito de E/S y una entrada para recibir una tira de ensayo. El lector está configurado para convertir los resultados del sensor en una señal de salida al activarse la fuente de energía en la región de ensayo de la tira de ensayo.

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a un kit de ensayo que comprende un sistema de ensayo. El kit de ensayo comprende una almohadilla de muestra, una tira de ensayo, nanopartículas conjugadas con una molécula de unión de analito, una región de ensayo que comprende moléculas de captura, una región de control y una almohadilla absorbente configurada para la comunicación fluida cuando se aplica una muestra. El kit también incluye un lector de ensayo de contraste térmico que comprende una fuente de energía, un microprocesador y un sensor. La región de ensayo está configurada para estar expuesta a una señal de energía aplicada por la fuente de energía. El sensor está configurado para medir la respuesta de calentamiento a la señal de energía aplicada generada en la región de ensayo. El microprocesador está configurado para analizar una pendiente y un nivel máximo de la respuesta térmica con el fin

de detectar la presencia o ausencia de un analito en la región de ensayo.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de analitos en una muestra que comprende exponer la región de ensayo a un sistema de tira de ensayo a una señal de energía aplicada por una fuente de energía después de poner en contacto la tira de ensayo del sistema de ensayo con una muestra. La muestra se mueve a través de la tira de ensayo por acción capilar y el sistema de ensayo comprende nanopartículas conjugadas con la molécula de unión al analito que se une al analito en la muestra y una región de ensayo que comprende moléculas de captura. El procedimiento también incluye medir la respuesta térmica a la señal de energía aplicada generada en la región de ensayo por un sensor y analizar una pendiente y un máximo nivel de respuesta térmica para detectar la presencia o ausencia del analito en la región de ensayo.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es un diagrama simplificado que muestra una tira de ensayo para un ensayo de flujo lateral y un sistema lector.

La Fig. 2A es un diagrama en bloque simplificado de un lector de ensayo portátil.

La Fig. 2B es un diagrama en bloque simplificado del lector de ensayo de sobremesa.

15 La Fig. 3 es un diagrama en bloque simplificado del lector de ensayo de la Figura 2A.

Las Fig. 4A y 4B son gráficos que ilustran la respuesta térmica de un LFA frente al tiempo.

La Fig. 5 es un gráfico que ilustra el uso de nanopartículas de oro (GNP) en un ensayo de contraste térmico.

La Fig. 6 es un gráfico que ilustra cómo el contraste térmico aumenta la detección de ensayos de flujo lateral inmunocromatográficos existentes para el antígeno criptocócico (CrAg). La plataforma de señal a altas concentraciones se debe al efecto de gancho de alta dosis del LFA. La línea discontinua muestra el fondo de la muestra de control.

20 La Fig. 7A es un gráfico a la concentración de nanopartículas frente al cambio de temperatura para diferentes formas de nanopartículas.

La Fig. 7B es un gráfico del cambio de temperatura para diferentes materiales.

25 La Fig. 8A es una representación esquemática de un dibujo de los resultados del ensayo de contraste térmico para hCG (gonadotropina coriónica humana).

La Fig. 8B es un gráfico de los resultados del ensayo de contraste térmico para hCG.

La Fig. 9 es un gráfico de los resultados del ensayo de contraste térmico para el antígeno de malaria.

30 La Fig. 10A y Fig. 10B son gráficos que ilustran el uso de SAR.

La Fig. 11 es un gráfico de resultados del ensayo de contraste térmico para hCG utilizando SAR.

Las Fig. 12A, 12B y 12C son dibujos que muestran la polidispersión de GNP y CrAg en la varilla de CrAg, varilla de hCG y GNP sintetizadas respectivamente.

La Fig. 13 es un gráfico que ilustra el tamaño uniforme de las GNP sintetizadas.

Descripción detallada

35 La presente invención se refiere a sistemas de ensayo que se usan en conjunto con un lector de contraste térmico. La presente invención también se refiere a procedimientos para detectar analitos en una muestra usando el ensayo de contraste térmico y los sistemas lectores. La presente invención incluye un ensayo con una tira de ensayo que presenta la característica térmica de que cambia en respuesta a compuestos diana específicos que pueden estar presentes en una muestra. La presente invención incluye un lector para la lectura de las propiedades térmicas de dicha tira de ensayo. Los aspectos de la presente invención se tratan posteriormente con mayor detalle.

40 Los sistemas de ensayo de contraste térmico son ensayos que están configurados para funcionar en conjunción con un lector de contraste térmico. Un ensayo de contraste térmico puede utilizarse ventajosamente para detectar analitos en muestras a concentraciones mucho más bajas que los ensayos utilizando lectores visuales. El sistema de contraste térmico puede ser un sistema de detección altamente sensible para analitos en una variedad de muestras. Esto hace posible ventajosamente la detección de enfermedades o afecciones en un estadio mucho más temprano en comparación con los LFA que utilizan los procedimientos de detección visual. Además, la simplicidad del procedimiento hace posible que el usuario final utilice el sistema con facilidad y precisión. Este sistema puede ser altamente adecuado para las instalaciones de atención primaria y escenarios con recursos limitados. Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a sistemas de ensayo de contraste térmico que se pueden utilizar para aumentar la sensibilidad, rango dinámico, y cuantificación de los LFA utilizados clínicamente.

45 La presente descripción también incluye un kit en el que el kit incluye un lector de contraste térmico y un sistema de ensayo que se describe en el presente documento. El kit se puede utilizar por el usuario final para procesar una muestra deseada utilizando el sistema de ensayo y entonces detectar el analito diana y/o la cantidad del analito diana utilizando el lector de contraste térmico. El kit puede incluir instrucciones relativas al uso del kit.

55 La presente descripción se refiere en general a la excitación con láser de nanopartículas, aunque se entiende que también otras realizaciones con excitación electromagnética están en el ámbito de la presente invención. La excitación con láser (o luz) de las nanopartículas a la que se hace referencia en el presente documento se refiere a la excitación de nanopartículas para producir calor que se puede leer por un sensor de calor u otro sensor de calor entendiendo que también son posibles otras realizaciones y están en el ámbito de la presente invención. El circuito de diagnóstico

acoplado a la salida del sensor se configura para proporcionar una indicación de un diagnóstico de salida de un diagnóstico de una afección del paciente en función de la salida del sensor

Los sistemas de ensayo que se describen en el presente documento se pueden utilizar para detectar analitos diana en una muestra utilizando nanopartículas conjugadas con moléculas de unión al analito. Específicamente, las nanopartículas en los ensayos se pueden utilizar eficazmente para convertir la luz de entrada en calor. En estos ensayos, se pone en contacto una membrana con una muestra que contiene potencialmente un analito. Según se mueve la muestra a través de la membrana, en general por acción capilar, las nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión al analito se unen al analito diana para formar un complejo nanopartícula/analito. "Complejo nanopartícula/analito" como se utiliza en el presente documento se refiere a nanopartículas conjugadas a las moléculas de unión al analito que se han unido al analito de la muestra. El complejo nanopartícula/analito continúa moviéndose a través de la membrana hacia la región de ensayo que contiene moléculas de captura que se unen al analito deseado. El complejo nanopartícula/analito se une a las moléculas de captura y se retienen en la región de ensayo. Un lector de contraste térmico descrito en el presente documento se puede utilizar entonces para detectar la presencia o ausencia del analito. Además el lector de contraste térmico también puede cuantificar la cantidad de analito presente en la región de ensayo, y en consecuencia, la muestra. El lector de contraste térmico incluye en general una fuente de calor y un sensor de calor configurados como se describe posteriormente.

Un sistema de ensayo, es decir, un LFA, incluye en general una almohadilla de muestra, una membrana, nanopartículas conjugadas a una molécula de unión al analito y moléculas de captura para el analito. El sistema LFA también puede incluir una almohadilla de conjugado, una almohadilla absorbente, un refuerzo, una región de ensayo, una región de control y/o combinaciones de todos estos componentes. La región de ensayo incluye en general moléculas de captura de analito. La región de control puede incluir una molécula de control tal como un anticuerpo de control. La almohadilla de conjugado en general incluye nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión al analito.

"Membrana" como se utiliza en el presente documento se refiere a un dispositivo de ensayo o tira que emplea una membrana y uno o más reactivos para detectar el analito diana en la muestra. "Membrana" y "tira de ensayo" se pueden utilizar de manera intercambiable.

Los ensayos que se pueden utilizar en conjunción con el lector de contraste térmico incluyen ensayos de flujo lateral. Se conoce en la técnica una variedad de configuraciones para llevar a cabo ensayos de flujo lateral y se describen, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE. UU. US 2003/0119202 por Kaylor y col. y en la Publicación de Patente de EE. UU. N° US 2010/0136566 por Mehra y col. y se incorporan en el presente documento por referencia. La Figura 1 ilustra una realización ejemplar y otras configuraciones para llevar a cabo ensayos de flujo lateral que se conocen en la técnica y también en el ámbito de la invención.

La Figura 1 es un diagrama simplificado que muestra una realización ejemplar de un sistema de ensayo y un lector del ensayo de flujo lateral de acuerdo con la presente invención. Una tira de ensayo 100 incluye una almohadilla de muestra 102 que está configurada para recibir una muestra 104 de un paciente. La acción capilar produce que la muestra 104 fluye desde la almohadilla de muestra 102 en la dirección indicada por la flecha 106 hacia la almohadilla absorbente 108. La muestra 104 fluye a través de una almohadilla de conjugado 110 y a través de la membrana 112 hasta que alcanza la región de ensayo 114. Se proporciona también una región de control 115 separada. La tira de ensayo 100, almohadilla de muestra 102, almohadilla absorbente 108, almohadilla de conjugado 110, región de ensayo 114 y la región de control 116 están en comunicación fluida. "Comunicación fluida" como se utiliza en el presente documento se refiere a la capacidad del líquido para fluir o viajar entre los materiales o superficies establecidos.

Como se ilustra en la inserción de la Figura 1, una realización ejemplar de la región de ensayo puede incluir nanopartículas de oro asociadas con un anticuerpo monoclonal unido con el antígeno en la región de ensayo 114. La cantidad de nanopartículas de oro unidas en la región de ensayo 114 se puede determinar aplicando energía 120 que produce el calentamiento de la región de ensayo 114. Un sensor térmico 122 dirigido a la región de ensayo 114 mide el calor de la región de ensayo 114 que se relaciona con la cantidad de nanopartículas y por lo tanto con la cantidad de antígenos presentes en la región de ensayo 114. Como se explica posteriormente con más detalle, esto se puede utilizar para diagnosticar una afección del paciente. La energía 120 puede ser cualquier forma de energía que produce el calentamiento de la región de ensayo 114. La fuente de energía 120 y el sensor 122 se pueden alojar en una unidad. De manera alternativa, pueden estar alojados por separado.

En la realización representada en la inserción de la Fig. 1, las moléculas de unión al analito y las moléculas de captura se muestran como anticuerpos monoclonales. La molécula de unión al analito y las moléculas de captura pueden ser el mismo tipo de molécula, es decir, un anticuerpo. En dichos casos, preferentemente se unen al analito en sitios diferentes, en otras palabras, la molécula de unión al analito y la molécula de captura preferentemente no se unen al mismo sitio o epítipo del analito. De manera alternativa la molécula de unión al analito y la molécula de captura pueden ser dos moléculas diferentes, pero ambas capaces de unirse al analito en diferentes sitios.

En la realización ejemplar que se trató anteriormente, las GNP revestidos de anticuerpos se mueve en una tira de nitrocelulosa mediante acción capilar después de que la tira se ha empapado o puesto en contacto con un espécimen clínico. Cuando está presente, el antígeno diana se une a una GNP revestida de anticuerpos monoclonales. Este

complejo de unión para de subir empapando la “barra indicadora” cuando es capturado por un anticuerpo en la membrana que reconoce el complejo antígeno-anticuerpo-GNP. Esto da lugar a la acumulación de GNP en la región de ensayo 114 del LFA, creando un resultado de ensayo positivo. Las GNP se han utilizado para los LFA debido a que su tamaño se puede diseñar para que migren a través de los poros de la membrana 112, las GNP pueden revestirse con anticuerpos fácilmente; y las GNP tienen una fuerte interacción con la luz visible produciendo así un color profundo que se visualiza fácilmente. Las GNP que tienen una fuerte interacción con la luz y otras longitudes de onda se pueden utilizar para la detección de contraste térmico, por ejemplo “nanobarras” de oro con una absorción máxima de luz cerca de los infrarrojos.

La Figura 2A es un diagrama en bloque simplificado de un lector de ensayo 200 portátil de acuerdo con una realización de ejemplo de la presente invención. El lector 200 incluye un alojamiento 202 que tiene una abertura 2094 en el mismo configurada para recibir el LFA 100 en una ranura o recipiente 206. En la Figura 2A, un láser 220 genera energía 120 dirigida a la región de ensayo del LFA 100. En la Figura 2A, la energía puede ser, por ejemplo, luz visible o cerca de los infrarrojos que se enfoca sobre la región de ensayo utilizando una lente 222 opcional. Como se trata en el presente documento, la luz visible o cerca de los infrarrojos dirigidas a las nanopartículas puede producir el calentamiento de las nanopartículas. Esto se detecta con un sensor 122 tal como un sensor de infrarrojos. Los resultados del ensayo se pueden representar en una pantalla 230 que puede comprender por ejemplo, una pantalla LCD. La pantalla puede proporcionar un resultado cuantitativo o un resultado cualitativo tal como una simple indicación de válido/no válido. Se proporciona una entrada para el usuario 232 opcional. Por ejemplo, esta entrada puede ser un simple botón que permite a un operador iniciar el ensayo, o puede ser una entrada más compleja tal como un teclado numérico o un teclado numérico que permite a un operado poner al día los parámetros tales como los valores del umbral que utiliza en dispositivo 200. La entrada 232 puede ser una capa de la pantalla 230 para proporcionar una pantalla táctil.

La operación del dispositivo 200 se controla por un circuito electrónico 240 como se describe posteriormente con más detalle. Esto puede incluir, por ejemplo, un microprocesador, convertidores de analógico a digital, circuito de E/S, etc. Se proporciona una fuente de energía 242. Preferentemente, la fuente de energía 242 es una fuente de energía portátil tal como una batería o similar. La fuente de energía puede ser opcionalmente recargable mediante una conexión a otra fuente eléctrica o utilizando una placa solar o similar.

Adicionalmente, el dispositivo 200 incluye un circuito (E/S) 310 de entrada/salida que se describe posteriormente con más detalle. El circuito de E/S 310 permite que los datos recolectados por el dispositivo 200 se transmitan o de otra manera se proporcionen a otros dispositivos. Por ejemplo, los resultados del ensayo se pueden recolectar y transmitir a una localización central o podría servir para una evaluación posterior.

La Figura 2B es un diagrama en bloque simplificado del lector de ensayo 200 configurado con una configuración “de sobremesa”. En la configuración de la Figura 2B, se utiliza una computadora identificada como un PC para llevar a cabo el ensayo. El PC 260 se acopla al láser 220 y al sensor de infrarrojos 122 mediante el circuito de E/S 262. El circuito de E/S 262 puede incluir por ejemplo, convertidores de digital a analógico, convertidores de analógico a digital, salidas que se pueden cambiar, etc. Normalmente, el PC 260 que se muestra en la Figura 2B tendrá más potencia de computación que la que está disponible en un dispositivo portátil. Esto puede permitir que se lleven a cabo ensayos adicionales o ensayos más avanzados.

Aunque se puede emplear cualquier componente apropiado, en una realización preferida. La fuente 220 comprende un láser, por ejemplo un láser verde de 532 nm (es decir, LRS-0532-PFM_00200-03, LaserGlow Technologies Inc.). Las lentes de enfoque 222 pueden comprender por ejemplo lentes de enfoque plano-convexas. Un sensor de infrarrojos adecuado incluye una cámara de infrarrojos (A20 o E30, FLIR Inc.) o sensor de infrarrojos (MLX90614, Melexis). Sin embargo, la presente invención no se limita a esta configuración.

La Figura 3 es un diagrama en bloque simplificado de un dispositivo 200 e incluye un microprocesador 200 que opera de acuerdo con las instrucciones almacenadas en una memoria 302. El microprocesador 300 controla la fuente de energía 200 activando el suministro de energía 302 de la fuente de energía. El calentamiento del LFA (no mostrado en la FIG. 3) se detecta por un sensor de calor 122 que proporciona una salida al convertidor analógico a digital 304. Se proporciona un sensor de tira 306 opcional. El sensor de tira 306 se puede configurar para detectar la presencia del LFA 100 en la ranura 206 permitiendo de esta manera que el microprocesador 300 active la fuente de energía 220 y comience el ensayo.

La Figura 3 muestra un circuito de recarga 308 opcional conectado a la alimentación eléctrica 242. Esto puede permitir que la alimentación eléctrica 242 se recargue, por ejemplo, utilizando una fuente de energía, una placa solar, una manivela mecánica, etc.

También se ilustra el circuito de entrada/salida 310 acoplado al microprocesador 300. Esto puede incluir cualquier tipo de dispositivo de entrada o salida incluyendo una pantalla, teclado o entrada manual, salida audible, salida digital tal como un USB o una conexión Ethernet, una entrada y/o salida de RF (radiofrecuencia) o IR (infrarrojos), una conexión de datos de móvil, una conexión Ethernet, etc. Un ejemplo de conexiones RF incluyen pero no se limitan a conexiones BLUETOOTH® u otras técnicas de conexión de corta distancia, conexiones WIFI, u otras. Las conexiones a un teléfono móvil permiten al dispositivo comunicarse utilizando una red de teléfono móvil para comunicar los datos y/o proporcionar cuan comunicación por voz opcional. Los datos pueden incluir los resultados del ensayo y la información

geográfica (localización GPS) para recoger información espaciotemporal de enfermedades infecciosas.

El uso de E/S 310 permite que los datos recogidos por el dispositivo 200 se envíen a otra localización. Por ejemplo, cuando se utiliza en el campo, el dispositivo 200 puede transmitir los resultados a una central de datos. Esta transmisión puede ser mediante cualquier técnica. Por ejemplo, los datos se pueden enviar mediante una conexión de internet, por red móvil, etc. La conexión puede necesitar una conexión por cable física o puede ser inalámbrica utilizando WIFI, bluetooth, etc. Adicionalmente, la E/S se puede utilizar para actualizar la información almacenada en la memoria 302. Por ejemplo, se pueden actualizar las instrucciones de programación, información de calibración u otros datos. La E/S 310 también se puede utilizar para comunicar con un operador de una localización remota utilizando la pantalla 230 y/o entrada 232.

Durante la operación, se coloca un LFA 100 (no mostrado en la FIG. 3) en el alojamiento 202, por ejemplo, mediante un puerto 204 (que se muestra en la FIG. 2). El proceso de ensayo se inicia mediante el microprocesador 300 en respuesta a una señal del sensor de la tira 306, o algún otro disparador como una entrada manual utilizando el circuito de entrada/salida 310. En una configuración, se proporciona un motor de pasos 307 y se controla por el microprocesador 300. El motor de pasos 307 se puede utilizar para automatizar el movimiento del LFA 100 en el dispositivo 200. Se pueden utilizar sensores de tira 306 múltiples, u otras configuraciones si se desea controlar la localización del LFA 100 en el dispositivo 200. Esto hace que el microprocesador 300 aplique electricidad hacia la fuente de energía 220 calentando de esta manera el LFA 100. La respuesta al calentamiento es captada por el sensor 122 y la convierte en una señal digital utilizando un convertidor de señal analógica a digital 304. Basándose en esta señal digitalizada, el microprocesador 300 proporciona una salida utilizando el circuito de entrada/salida 310 que es indicativa de los resultados del ensayo.

Adicionalmente, la Figura 3 muestra un sensor de retroalimentación 303 que se dispone en la ruta de la fuente 220 con el fin de captar la fuerza de la energía aplicada. La salida del sensor 303 se proporciona al procesador 300 mediante un convertidor de analógico a digital 305. Por ejemplo, el sensor 303 puede ser un sensor de luz para captar la intensidad de la salida de un láser 220. Esta información se puede utilizar para calibrar la operación del dispositivo y calibrar el calentamiento captado. Además, la retroalimentación se puede utilizar con fines diagnósticos con el fin de detectar una fuente 220 que está emitiendo una señal débil o que falla completamente.

La memoria 302 se utiliza por el microprocesador para el almacenamiento de la información a corto y largo plazo. Por ejemplo, la información 320 de dirección del dispositivo 200 se puede almacenar en la memoria 302. Esta dirección puede ser, por ejemplo, una dirección que identifica únicamente o semi-únicamente el dispositivo 200 y puede incluir, pero no se limita a una dirección de protocolo de internet (IP), una dirección Mac, u otro formato de dirección. La memoria 302 también se puede utilizar para almacenar la información de calibración que se puede utilizar para calibrar los datos recibidos del sensor 122. La información de calibración se puede determinar de distintas maneras incluyendo, por ejemplo, durante la fabricación del dispositivo, entrada utilizando el circuito 310, o basándose en una calibración que se lleva a cabo utilizando un LFA 100, por ejemplo, utilizando la región de calibración 116 que se muestra en la Figura 1. Esta información de calibración puede proporcionar una línea base u otro tipo de compensación de las lecturas proporcionadas por el sensor 122. La memoria 302 también incluye las instrucciones de operación 324 que se utilizan para controlar la operación del microprocesador 300.

Las Figura 4A y 4B son gráficos que ilustran la respuesta al calentamiento del LFA 100 cuando se aplica energía 120, T_S . La cantidad de calor alcanza un máximo indicado por R_M . Adicionalmente, como se ilustra en las Figuras 4A y 4B, la respuesta tiene una pendiente que comienza en su aumento más empinado y se estabiliza lentamente hasta el nivel máximo R_M . El microprocesador 300 opera como un circuito diagnóstico analizando la respuesta al calor respecto a la señal de energía aplicada. Por ejemplo, un simple nivel de umbral puede utilizarse de manera que la respuesta máxima se compara con un nivel umbral. Estos se pueden proporcionar como una salida, por ejemplo, una salida "válido/no válido" basándose en la comparación. Además, se puede proporcionar una salida cuantitativa basándose en el nivel de respuesta máxima. Esta salida cuantitativa puede ilustrar la cantidad de nanopartículas de oro que han sido capturadas en la localización de ensayo 114 (que se muestra en la FIG. 1). Estos se pueden correlacionar, por ejemplo, con la cantidad de antígeno y por lo tanto la progresión de la enfermedad en el paciente.

En un aspecto de la presente invención, el diagnóstico se basa en el perfil de la respuesta. Por ejemplo, en las FIG. 4A y 4B, se ilustra una pendiente inicial de la respuesta. Basándose en esta pendiente inicial, es posible extrapolar el valor de R_M sin necesidad de permitir que el calentamiento alcance el valor máximo. Esta técnica se puede utilizar para aumentar la velocidad del procedimiento de ensayo. Además, esta información se puede utilizar también para verificar el valor de R_M detectado por el sensor 122. Por ejemplo, si el valor extrapolado de R_M se diferencia significativamente del valor medido de R_M , será una indicación de un componente que falla, una tira de ensayo dañada, o algún otro error en la medición. Además, como se ha tratado anteriormente, la información de calibración se puede utilizar para mejorar la precisión de las mediciones. Por ejemplo, la información de calibración puede proporcionar una respuesta de línea base con la que se compara la señal de respuesta. Por lo tanto, los niveles del umbral de la respuesta se pueden ajustar basándose en la información de calibración.

La fuente de energía 220 puede ser cualquier fuente de energía apropiada. En una realización preferida, la fuente de energía 220 comprende un láser. Se conoce una variedad de láseres en la técnica para su uso como una fuente de calor y puede ser, por ejemplo, un láser de onda continua, un láser de onda pulsátil, o un láser de tamaño reducido.

La sensibilidad al contraste térmico se puede aumentar utilizando láseres de alta potencia y/o sintonizando la energía láser para diferentes concentraciones de GNP para extender el rango dinámico. El láser puede emitir luz en el rango visible. Los láseres también se pueden utilizar para emitir luz cerca de la región infrarroja. En general, el láser se selecciona y sintoniza para maximizar la absorción en las nanopartículas mientras que se minimiza la interferencia de los materiales de fondo. La cantidad de potencia del láser que se utiliza en el sistema LFA puede variar y depende de los componentes del ensayo. En una realización ejemplar, la potencia del láser estaba entre aproximadamente 5 W y aproximadamente 50 W (láser de onda continua). Sin embargo se pueden utilizar niveles de energía mayores o menores en otras realizaciones. Por ejemplo, se puede aplicar una menor energía total pero una mayor densidad energética con el láser pulsado. Con la reducción de la absorción por el fondo que se trata posteriormente, se puede utilizar una mayor potencia de láser para mejorar adicionalmente la sensibilidad y la fuerza de la señal.

En general, la membrana, y el armazón incluyen materiales que tiene una mínima absorción de luz. El calentamiento del fondo limita la capacidad para utilizar una energía más alta para obtener una mayor fuerza de señal. Seleccionando materiales que tengan una mínima absorción de luz, la lectura térmica el fondo se puede reducir para asegurar que la detección térmica es de las nanopartículas de la región de ensayo y no de los materiales del sistema de ensayo. La membrana en el sistema LFA generalmente es de un material poroso que contiene una pluralidad de intersticios o poros. El líquido puede fluir a través de estos intersticios o poros en general por acción capilar. El material poroso se puede fabricar de sustancias naturales o sintéticas. Los materiales porosos adecuados para su uso en los sistemas LFA pueden incluir, por ejemplo, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), polietileno, nilón, acetato de celulosa, poliéster, poliéter sulfona (PES) polisulfona y similares. Una realización preferida utiliza la membrana que tenga la absorción de luz menor. Se pueden utilizar también otros materiales porosos que se conocen en la técnica. Se conoce una variedad de armazones en la técnica y principalmente proporcionan un soporte estructural al LFA. Para la detección del contraste térmico, los materiales que tienen una absorción de luz mínima se prefieren como armazón en los LFA descritos en el presente documento. En una realización preferida, el armazón puede estar fabricado de cristal o plástico (por ejemplo, poliestireno). La almohadilla de muestra puede estar fabricada de una variedad de materiales incluyendo, por ejemplo, poliéster, materiales poliacrílicos y otros poliméricos o fibra de vidrio. La almohadilla de conjugado y almohadilla absorbente se pueden fabricar, por ejemplo, de materiales celulósicos o similares.

Las nanopartículas metálicas generan calor con la estimulación óptica. La generación de calor resulta de plasmones superficiales en la interfaz metal-dieléctrica durante la transición de un estado excitado a tierra. La cantidad de calor generado por las GNP, por ejemplo, se puede describir por la siguiente ecuación:

$$30 \quad \mathbf{Q = NQ_{nano} = NC_{abs}I} \quad \mathbf{ECUACIÓN (1)}$$

en la que la generación de calor total (Q , W/m^3) es la contribución combinada de una única GNP (Q_{nano}), que se escribe como el producto de la concentración de GNP (N , n^0/m^3), la absorción por la sección transversal de GNP (m^2), y la intensidad del láser (W/m^2).

Las nanopartículas pueden comprender una variedad de materiales, formas y tamaños. Las nanopartículas pueden ser nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre, nanopartículas de platino, nanopartículas de aluminio, nanopartículas de cadmio, partículas compuestas, es decir de plata y oro, nanopartículas de grafeno, y similares. En una realización preferida el sistema de ensayo LFA incluye nanopartículas de oro. Otros tipos de nanopartículas también se pueden emplear y están en el ámbito de la presente descripción. En realizaciones alternativas, se puede utilizar una combinación de dos o más tipos de nanopartículas. Estas se pueden utilizar para identificar múltiples analitos o para amplificar o aumentar la señal.

Las nanopartículas pueden incluir un intervalo de tamaño y en general deben ser capaces de viajar a través de la membrana. Preferentemente, el diámetro de las nanopartículas puede variar desde 10 nm a 200 nm. La selección y optimización del tamaño de nanopartícula depende parcialmente de la absorción de energía. Para una realización preferida con un láser como fuente de energía y nanopartículas de oro, el fenómeno físico llamado resonancia de plasmones aumenta la absorción óptica y por lo tanto la generación de calor. Se pueden utilizar nanopartículas de oro de aproximadamente 100 nm de diámetro. Están disponibles tamaños mayores, y también se pueden utilizar y están incluidos en el ámbito de la presente invención. En algunas realizaciones, las GNP con tamaños de aproximadamente 40-80 nm tiene una mayor eficacia de absorción (definida como $Q_{abs} = C_{abs}/A$ en la que C_{abs} es la absorción de sección transversal y A es el área de sección transversal proyectada de la partícula) y son por tanto preferidas desde el punto de vista de generación de calor.

Se puede utilizar una variedad de formas de nanopartículas en el sistema de LFA descrito en el presente documento y todas están en el ámbito de la invención. Las nanopartículas pueden ser, por ejemplo, nanoesferas, nanobarras, nanoconchas, nanocubos, nanoerizos, nanopirámides, nanoestrellas, y similares. En realizaciones preferidas, las nanopartículas son nanoesferas, nanobarras y/o nanoconchas. Se puede utilizar cualquiera de estas formas de nanopartículas. Son preferibles las nanopartículas con la mayor eficacia de absorción óptica y que puedan ser funcionales en el ensayo con respecto a otras propiedades. Para las partículas con forma nanoesférica, se puede utilizar el radio eficaz (esfera con volumen equivalente) para calcular la eficacia de absorción.

La polidispersión de las GNP en los LFA existentes no está bien controlada, como se ve en las Figs. 12A-C y 13 para las varillas de CrAg y hCG. El mejor control de la polidispersión da lugar a una distribución de tamaño de nanopartículas

más uniforme. Esto puede dar lugar a desviaciones típicas más pequeñas para la detección del contraste térmico, y por lo tanto mejora la estabilidad y la consistencia de la señal. Las nanopartículas más uniformes también pueden dar una absorción óptica y generación de calor mayor. Por ejemplo, las GNP con diferentes tamaños tienen un pico de absorción a diferentes longitudes de onda. Para una población de GNP polidispersas, habrá menos GNP que generen calor a una longitud de onda del pico de absorción, y por tanto se reducirá la cantidad de calor generado. En una muestra de nanopartículas, son preferibles nanopartículas bien dispersas de tamaño uniforme a agrupamientos de nanopartículas. El agrupamiento de nanopartículas puede dar lugar a menos absorción uniforme por las nanopartículas. Las nanopartículas pueden cubrirse, opcionalmente para disminuir el agrupamiento, aumentando de esta manera la uniformidad de absorción. El revestimiento, si está presente, preferentemente no reduce la absorción en las nanopartículas.

La distribución del tamaño de las nanopartículas puede variar. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 60 por ciento de las nanopartículas están en +/-10 nm del diámetro medio de las nanopartículas. Preferentemente, al menos un 70 por ciento de las nanopartículas están en aproximadamente +/-5 nm del diámetro medio de las nanopartículas. Más preferentemente, al menos aproximadamente un 70 por ciento de las nanopartículas están en aproximadamente +/- 3 nm del diámetro medio de las nanopartículas. Más preferentemente, al menos un 75 por ciento de las nanopartículas están en aproximadamente +/- 3 nm del diámetro medio de las nanopartículas. Las nanopartículas fuera de estos intervalos también están en el ámbito de la invención.

La cantidad o concentración de nanopartículas que se utilizan en un sistema de LFA puede variar dependiendo de los ensayos específicos, las nanopartículas específicas, las moléculas de unión al analito y similares. En general, la cantidad de nanopartículas puede estar en el orden de aproximadamente 1-100 µg. También se pueden utilizar cantidades de nanopartículas fuera de este intervalo y están en el ámbito de la presente invención. Para una realización, el ensayo CrAg utiliza aproximadamente 4 µg de GNP por LFA. La cantidad de nanopartículas que se utilizan puede ser mayor o menor que el intervalo especificado dependiendo de la afinidad de unión de las moléculas de unión, el intervalo de concentración del analito diana y las muestras del paciente, entre otros factores.

Los analitos en una variedad de muestras se pueden determinar y generalmente pueden ser cualquier tipo de muestra líquida. Las muestras pueden ser muestras biológicas, muestras químicas, muestras ambientales, muestras alimentarias y similares. Las muestras biológicas pueden incluir, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, sudor, bilis, líquido cefalorraquídeo, material fecal, fluidos vaginales, saliva y similares. Otras muestras biológicas también se pueden analizar, y están todas dentro del ámbito de la presente invención. La muestra con el analito se puede utilizar directamente o diluirse utilizando un diluyente. El diluyente puede ser una variedad de soluciones y se conocen en general en la técnica. En una realización ejemplar, el diluyente es solución salina.

Se puede detectar una variedad de analitos utilizando los procedimientos y dispositivos de la presente descripción. Un analito diana puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, hapteno, producto químico y similares. Los analitos pueden incluir también fármacos terapéuticos, drogas adictivas, hormonas, vitaminas, proteínas glucosadas, anticuerpos, esteroides, bacterias o infección bacteriana, hongos, virus, parásitos componentes y productos de bacterias, antígenos y similares. Un analito también incluye derivados o metabolitos del compuesto de interés.

En algunas realizaciones, el analito se puede asociar a una enfermedad, por ejemplo, malaria, TB y similares. En otras realizaciones, el analito se puede asociar con una afección patológica o fisiológica, por ejemplo gestación. Ejemplos de analitos incluyen el antígeno criptocócico (CrAg), antígeno de malaria, antígeno de tuberculosis, gonadotropina humana (hCG), hormona luteinizante humana (hLH), hormona foliculo-estimulante humana (hFSH), antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de superficie de hepatitis B, anticuerpos de hepatitis B, antígeno del VIH, Streptococcus A, bacterias Staphylococcus, STD, P. falciparum, panel de fiebre y similares.

Las moléculas de unión al analito y las moléculas de captura pueden ser cualquier molécula que sea capaz de unirse al analito diana. En algunas realizaciones, las moléculas de unión al analito y las moléculas de captura son macromoléculas biológicas, por ejemplo, anticuerpos o partes de anticuerpos. Estas moléculas también pueden ser receptores, ligandos, polinucleótidos, polipéptidos, glicopéptidos, lipoproteínas, nucleoproteínas, ácidos nucleicos, aptámeros, y similares. En una realización ejemplar, las moléculas de unión al analito y las moléculas de captura son anticuerpos. En algunas realizaciones, las moléculas de unión al analito son las mismas que las moléculas de captura. En otras realizaciones, las moléculas de unión al analito son diferentes que las moléculas de captura.

En la materia se conocen una variedad de procedimientos para conjugar o acoplar las nanopartículas con las moléculas de unión al analito y todos están dentro del ámbito de la presente invención. En general, es preferible la conjugación química que permita una mejora de la estabilidad a altas temperaturas, altas o bajas humedades y/o condiciones radioactivas. Unión química se refiere al uso de grupos funcionales químicos y/o moléculas que unen las partículas a la molécula de unión al analito. Un ejemplo es la colocación de ácidos carboxílicos en la superficie de las partículas para permitir la unión a grupos amina funcionales en un anticuerpo mediante una molécula mediada por carbodiimida. La conjugación puede implicar la adsorción pasiva. La adsorción pasiva se conoce en la técnica y se desvela por ejemplo en el documento US 2010/0136566 incorporado en el presente documento por referencia.

Una variedad de tecnologías de dispersión de líquidos y pulverización se conocen en la técnica para el depósito de las moléculas de captura en la membrana. Cualquiera de estas se puede utilizar y son preferidas las tecnologías de

pulverización que dan lugar a una mejor absorción y estabilidad de las moléculas de captura. Las nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión al analito también se pueden pulverizar en la almohadilla de conjugado. En una realización ejemplar, se puede utilizar una variedad de instrumentos de dispersión de líquidos de BioDot™ para estos fines.

- 5 La presente descripción también incluye un procedimiento de detección de un analito en una muestra. La sensibilidad analítica del LFA se puede mejorar sustancialmente, potencialmente >10.000 veces sobre los procedimientos de detección visual por el uso de la tecnología de contraste térmico descrita en el presente documento.

10 El procedimiento incluye la puesta en contacto de una muestra con la almohadilla de muestra permitiendo que el líquido fluya a través de la membrana por acción capilar. Las nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión al analito se mueven por la membrana mediante acción capilar en respuesta a la aplicación de la muestra. Cuando está presente, el analito diana se une a las nanopartículas conjugadas. El complejo nanopartícula/analito detiene su movimiento a través de la membrana cuando la molécula de captura de la región de ensayo reconoce y se une al complejo nanopartícula/analito. Esto da lugar a la acumulación del complejo nanopartícula/analito en la zona de ensayo o región del LFA. El procedimiento incluye además el uso de un lector de contraste térmico para detectar y
15 cuantificar la cantidad de analito en la región de ensayo exponiendo en primer lugar la región de ensayo a una fuente de energía tal como un láser y después midiendo el calor generado por la tira de ensayo por un sensor. La salida generada por el sensor es indicativa de la presencia y/o la cantidad del analito diana.

20 El procedimiento también puede incluir la detección de múltiples analitos. Se pueden detectar múltiples analitos por tener múltiples regiones de ensayo, en las que cada región de ensayo tiene diferentes moléculas de captura. Por lo tanto, el primer complejo nanopartícula/analito se une a la región de ensayo 1 que tiene una primera molécula de captura se une al primer analito, en el que el segundo complejo nanopartícula/analito se une a la región de ensayo 2 que tiene una segunda molécula de captura que se une al segundo analito y no al primer analito. De esta manera, el sistema de LFA se puede extender para identificar múltiples analitos configurando la inclusión de múltiples regiones de ensayo. También se pueden detectar analitos utilizando múltiples nanopartículas que tienen diferentes posiciones de partida. Las nanopartículas pueden tener diferentes conjugados y diferentes moléculas de unión al analito. Estos se pueden ajustar para que tengan diferentes flujos a través de la membrana. Los múltiples analitos pueden estar en la misma muestra o muestras diferentes. En algunas realizaciones, se pueden ensayar múltiples analitos en la misma región de ensayo. La detección de los múltiples analitos da como resultado la identificación, preferentemente con una cantidad cuantitativa de analito, para cada uno de los analitos en la región de ensayo correspondiente. En algunas
25 realizaciones, se pueden detectar también múltiples analitos y/o cuantificarse acumuladamente en una región de ensayo. Por ejemplo, utilizando diferentes partículas que absorben diferentes longitudes de onda láser que permiten la multiplicación utilizando una excitación de láser con las correspondientes longitudes de onda.

30 El procedimiento también puede incluir la amplificación de las señales mediante el uso de un flujo controlado secundario de diferentes nanopartículas. En una realización ejemplar, la señal de un LFA con nanopartículas primarias de oro se puede amplificar por el uso de nanopartículas de unión secundarias o teñidas con plata. En el procedimiento de la tinción con plata, las nanopartículas de oro pueden actuar como un sitio de nucleación para el crecimiento de una cubierta de plata en la superficie. En el procedimiento de nanopartícula de unión secundaria, la nanopartícula secundaria se une a la primera partícula que captura el analito diana para amplificar la señal.

35 El presente procedimiento también incluye la cuantificación de la cantidad de analito presente en la región de ensayo. La medición del cambio térmico de la membrana se puede correlacionar con la cantidad de analito presente en la región de ensayo. El sistema LFA puede proporcionar ventajosamente no solo la presencia o ausencia de analito sino también proporciona el nivel de analito presente en la membrana y consecuentemente en la muestra. Esto es particularmente ventajoso para determinar el alcance de la enfermedad, infección o afección en un paciente.

40 Después de exponer la región de ensayo a una fuente de energía, la presencia y cantidad de analito se puede detectar midiendo el cambio térmico o temperatura en la región de ensayo de la membrana. De manera alternativa, la tasa inicial del cambio de temperatura también se puede medir para determinar la tasa de absorción específica (SAR). Se puede utilizar la SAR para determinar la cantidad de analito presente en la región de ensayo. La SAR es en efecto la Q de la Ecuación 1 anterior. Esto se refiere a la cantidad de energía calórica en W/m^3 emitida por las nanopartículas una vez que se han activado por una fuente de energía tal como un láser. Como se muestra en la Ecuación 1, es
45 directamente proporcional al flujo de láser y el número de nanopartículas que se relaciona directamente con la cantidad de antígeno en el analito.

50 Junto con la mejora de la sensibilidad analítica, los LFA se pueden también archivar para futuros análisis. A diferencia de otros procedimientos de detección, no hay pérdida de señal utilizando el sistema de contraste térmico. En las mediciones por fluorescencia, los fluoróforos orgánicos experimentan un fotoblanqueamiento. En algunas mediciones colorimétricas, los colorantes pueden perder su señal con el tiempo debido a la fotodestrucción. Las lecturas de contraste térmico que se llevaron a cabo después de dos semanas de llevar a cabo el ensayo pueden ser casi idénticas. Esto permite ventajosamente el procesamiento de LFA en el centro de atención primaria en el campo y referirlo a un laboratorio central para procesar el mismo sistema LFA para las lecturas de contraste térmico. En otras palabras, la señal del analito no tiene que medirse inmediatamente después de que se procesa la muestra. La señal puede medirse
55 múltiples veces, por ejemplo, inmediatamente después de que se complete el ensayo y también en un momento

posterior. El procedimiento puede incluir también la exposición de la región de ensayo a la fuente de energía y medir el analito en la región de ensayo después de doce horas, 24 horas o más después de poner en contacto la tira de ensayo con la muestra.

5 La criptococosis está entre las causas que dan lugar a la muerte entre las infecciones oportunistas relacionadas con el SIDA y es la causa más común de meningitis en adultos en África que producen >500.000 muertes en todo el mundo anualmente. La meningitis criptocócica se diagnostica clásicamente por una combinación de cultivo, tinta India, o ensayo del CrAg con semi-cuantificación por diluciones de dos veces en serie (es decir, título de CrAg, definido como el último ensayo positivo cuando se lleva a cabo diluciones de dos veces en serie).

10 La presente descripción incluye un procedimiento para la detección y cuantificación del antígeno CrAg. El procedimiento incluye poner en contacto una muestra con la almohadilla de muestra y permitir que el líquido fluya a través de la membrana por acción capilar. Las nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión a CrAg se mueven en la membrana mediante acción capilar en respuesta a la aplicación de la muestra. Cuando está presente, el CrAg se une a las nanopartículas conjugadas. El complejo nanopartícula/CrAg detiene su movimiento a través de la membrana cuando la molécula de captura de la región de ensayo reconoce y se une al complejo nanopartícula/CrAg.
15 Esto da lugar a la acumulación del complejo nanopartículas/CrAg en la región de ensayo del LFA. El sistema de contraste térmico se puede utilizar para detectar y cuantificar la cantidad de CrAg en la región de ensayo exponiendo en primer lugar la región de ensayo a una fuente de calor tal como un láser y después midiendo el calor generado por la tira de ensayo mediante un sensor de calor.

20 La Figura 6 muestra que el contraste térmico producía una mejora 32 veces mayor en la sensibilidad analítica que la detección colorimétrica con una pendiente lineal logarítmica hasta una concentración equivalente de un título 1:1024 de CrAg por aglutinación en látex ($R^2 = 0,98$). Por encima de este título de 1:1024, hay un efecto "gancho" de dosis alta con una disminución de la intensidad visual y una intensidad térmica plana. Esto se puede soslayar cambiando la dilución del ensayo, o cambiando la configuración del ensayo. Además, la precisión entre-ensayos del ensayo se puede mejorar normalizando el tamaño de estas nanopartículas para disminuir el coeficiente de varianza. Por
25 comparación, la mediana del título de CrAg observado en pacientes con meningitis criptocócica es a menudo de 1:1024 a 1:2048. Sin embargo, hay una aparición sub-aguda durante semanas a meses con títulos de CrAg > 1:8 en personas asintomáticas con enfermedad subclínica predictiva de un desarrollo posterior de meningitis criptocócica con un 100 % de sensibilidad y un 96 % de especificidad a pesar de la terapia contra VIH. La exploración de CrAg en el suero y el tratamiento antifúngico preventivo en personas vivas con SIDA avanzado aborta la progresión clínica de meningitis
30 sintomática. La exploración no invasiva es posible siendo detectable el CrAg en orina, pero la orina tiene una concentración 22 veces más baja que la sangre. Por lo tanto, la mejora de la sensibilidad en el LFA por el contraste térmico puede hacer posible la exploración o invasiva de personas asintomáticas con SIDA, y la capacidad para cuantificar la carga de CrAg para la estratificación del riesgo.

35 La presente descripción incluye un procedimiento para la detección y cuantificación del antígeno de hCG. El procedimiento incluye la puesta en contacto de una muestra con la almohadilla de muestra y permitir que el líquido fluya a través de la membrana por acción capilar. Las nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión a hCG se mueven en la membrana mediante acción capilar en respuesta a la aplicación de la muestra. Cuando está presente la hCG se une a las nanopartículas conjugadas. El complejo nanopartícula/hCG detiene su movimiento a través de la membrana cuando la molécula de captura en la región de ensayo reconoce y se une al complejo
40 nanopartícula/hCG. Esto da lugar a la acumulación del complejo nanopartícula/hCG en la región de ensayo del LFA. El sistema de contraste térmico se puede utilizar para detectar y cuantificar la cantidad de hCG en la región de ensayo exponiendo en primer lugar la región de ensayo a una fuente de calor tal como un láser y después midiendo el calor generado en la tira de ensayo por un sensor de calor.

45 La presente descripción incluye un procedimiento para la detección y cuantificación del antígeno de malaria. El procedimiento incluye la puesta en contacto de una muestra con la almohadilla de muestra y permitir que el líquido fluya a través de la membrana por acción capilar. Las nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión al antígeno de malaria se mueven en la membrana mediante acción capilar en respuesta a la aplicación de la muestra. Cuando está presente, el antígeno de malaria se une a las nanopartículas conjugadas. El complejo
50 nanopartícula/antígeno de malaria detiene su movimiento a través de la membrana cuando la molécula de captura en la región de ensayo reconoce y se une al complejo nanopartícula/antígeno de malaria. Esto da lugar a la acumulación del complejo nanopartícula/antígeno de malaria en la región de ensayo del LFA. El sistema de contraste térmico se puede utilizar para detectar y cuantificar la cantidad de hCG en la región de ensayo exponiendo en primer lugar la región de ensayo a una fuente de calor tal como un láser y después midiendo el calor generado en la tira de ensayo por un sensor de calor.

55 La presente descripción incluye un procedimiento para la detección y cuantificación del antígeno de TB. El procedimiento incluye la puesta en contacto de una muestra con la almohadilla de muestra y permitir que el líquido fluya a través de la membrana por acción capilar. Las nanopartículas conjugadas con las moléculas de unión al antígeno de TB se mueven en la membrana mediante acción capilar en respuesta a la aplicación de la muestra. Cuando está presente, el antígeno de TB se une a las nanopartículas conjugadas. El complejo nanopartícula/antígeno
60 de TB detiene su movimiento a través de la membrana cuando la molécula de captura en la región de ensayo reconoce y se une al complejo nanopartícula/antígeno de TB. Esto da lugar a la acumulación del complejo

nanopartícula/antígeno de TB en la región de ensayo del LFA. El sistema de contraste térmico se puede utilizar para detectar y cuantificar la cantidad de hCG en la región de ensayo exponiendo en primer lugar la región de ensayo a una fuente de calor tal como un láser y después midiendo el calor generado en la tira de ensayo por un sensor de calor.

5 Ejemplos

Ejemplo 1 – Síntesis y análisis de GNP

Síntesis de nanopartículas de oro (GNP): Se sintetizaron GNP de 30 nm por reducción con citrato de ácido cloroáurico y luego se revisten con polietilenglicol (PEG) para mantener la estabilidad en soluciones acuosas como se describe en Frens G., Perrault y col. y Neha y col. (Véase Frens G. Nat. Phys. Sci. 1973; Perrault, Steven D. y col. Nano Letters 2009 9 (5) 1909-1915; Neha B. Shah y col. Molecular Pharmaceutics 2012 9 (8) 2146-2155. Se llevaron a cabo las caracterizaciones de las GNP por un espectrofotómetro UV-Vis, espectroscopia de emisión atómica, dispersión de luz dinámica y TEM para asegurar el éxito de la síntesis y cuantificar la concentración y el tamaño. Se prepararon las concentraciones tituladas de soluciones de agua GNP y se transfirieron 10 µl de cada solución a un portaobjetos de cristal en forma de gota. Entonces se irradió con un rayo láser CW (532 nm, Milenia Vs, impulsado por un diodo) la gota durante 1 minuto, induciendo de esta manera la generación de calor en la GNP. Se montó una cámara de infrarrojos (FLIR ThermoVision™ A20) en un ángulo encima de la muestra para medir el cambio de temperatura remotamente durante la irradiación con el láser. Se determinó el cambio de temperatura para cada muestra a partir de las imágenes térmicas y se representó.

Se comparó el contraste térmico frente al contraste visual de GNP en solución. Se preparó una serie de concentraciones diferentes de GNP. Se colocaron 10 µl de una solución de GNP en un portaobjetos de microscopio. Para el análisis visual se tomó una foto con una cámara digital y se analizó más tarde con Image J. Para el análisis térmico, se irradió la solución de GNP con láser (0,5 W, 532 nm) y se registró el cambio de temperatura con una cámara de infrarrojos.

Los resultados mostraban que las GNP se pueden detectar desde $2,5 \times 10^9$ nanopartículas/ml de GNP utilizando el contraste térmico en comparación con $2,5 \times 10^{11}$ nanopartículas/ml por contraste visual. Esto demostraba claramente que el contraste térmico para la detección puede mejorarla sensibilidad analítica total unas 100 veces (Fig. 5). El contraste térmico de GNP también se comparó con la medición de la densidad óptica convencional utilizando un lector de placas de micro-volumen convencional, cuyo principio se utiliza ampliamente en ELISA de microfluídica. Con el mismo volumen de muestras (10 µl), el contraste térmico presentaba una mejora de 50 veces sobre la medición de la densidad óptica. La mejora adicional en la sensibilidad del contraste térmico puede ser posible utilizando láseres de mayor potencia y/o ajustando la potencia del láser para diferentes concentraciones de GNP para extender el rango dinámico del contraste térmico. De manera importante, ajustando la longitud de onda del láser a una nanopartícula de absorción más alta (nanobarras de oro) los inventores también fueron capaces de aumentar la sensibilidad.

Ejemplo 2 – Detección del antígeno criptocócico (CrAg)

Se ensayó la actuación analítica del contraste térmico frente a la detección colorimétrica (es decir, el contraste visual) utilizando LFA aprobados por la FDA para detectar el antígeno criptocócico (CrAg) obtenidos en Immy, Inc. y que se describen en Qin y col. Angewandte Chemie 2012. Creación de imágenes de contraste térmico: El LFA de antígeno criptocócico (Immy, Inc. Norman, OK), que fue aprobado por la FDA en julio de 2011, detecta los antígenos del polisacárido capsular de un complejo de especies de Cryptococcus (Cryptococcus neoformans y Cryptococcus gattii) en el suero y en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Una muestra de suero de un paciente con meningitis criptocócica que tenía diluciones de 2 veces en serie actuaba para evaluar los límites de detección, como el título CrAg. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo el contraste térmico irradiando la línea de ensayo por un láser durante 1 minuto. Una cámara de infrarrojos registraba el cambio de temperatura. Se irradian tres puntos sobre cada banda de ensayo horizontal, y se midió el cambio de temperatura máximo medio. A cada concentración, se ejecutaron tres varillas de LFA por separado. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

Cuantificación de contraste visual: Para las gotas con GNP, se tomaron imágenes con una cámara digital. Las varillas se exploraron con un escáner de lecho plano (Modelo: Visioneer Onetouch 7400). Se analizó la intensidad media de Gris para las regiones de interés (ROI), es decir, las gotas y la banda de ensayo de las varillas. El mismo volumen de solución de GNP (10 µl) también se midió por un espectrofotómetro a 530 nm, con una placa de micro-volumen Take 3 y un lector de microplacas Synergy HT Multi-Mode (BioTek, Winooski, VT).

Se compararon las diluciones de 2 veces en serie del LFA de una muestra de suero, con un título positivo de 1:32768 por aglutinación en látex (Immy Inc.). Los resultados demostraban que el contraste térmico era además más sensible que la detección visual colorimétrica en el LFA. La Fig. 6 muestra el contraste térmico producía una mejora de 23 veces de la sensibilidad analítica que la detección colorimétrica con una pendiente lineal logarítmica hasta una concentración equivalente de título de CrAg de 1:1024. Por encima de este título de 1:102, había un efecto “gancho” de dosis alta con una disminución de la intensidad visual y una intensidad térmica plana.

Utilizando LFA del antígeno criptocócico (CrAg) aprobados por la FDA, se vio una mejora de 32 veces en la sensibilidad analítica con el contraste térmico (Fig. 6) mientras que se cuantificaba simultáneamente la concentración de antígeno.

Esta sensibilidad mejorada en un modelo de “RDT desechable con un lector” puede hacer posible la exploración y cuantificación de un CrAg en áreas de recursos limitados para CrAg+ sintomáticos y asintomáticos permitiendo una terapia antifúngica preventiva en pacientes previamente no detectados por los LFA cualitativos.

Ejemplo 3 – Sensibilidad analítica mejorada de los LFA

5 Se llevó a cabo el modelo basándose en la absorción en las secciones transversales medida experimentalmente de una variedad de nanopartículas de oro tal como barras de oro, conchas, y nanoesferas de oro para explorar una mejora adicional de la sensibilidad analítica de los LFA. Se evaluaron las nanopartículas de oro incluyendo las nanobarras de oro, nanoconchas y nanoesferas de oro. Como se muestra en la Fig. 7A a una potencia de láser y concentración equivalentes, las nanobarras y nanoconchas típicas generan 4,6 veces y 36 veces más calor que las nanoesferas de oro, respectivamente. Para eliminar el efecto de tamaño de partícula, la absorción de la sección transversal (C_{abs}) se normalizó por volumen de partícula (V) para dar una evaluación mejor de la capacidad de generación de calor. Los tamaños de las GNP utilizadas para esta comparación eran: esfera $D = 30$ nm, nanobarra $D = 12,7$ nm por $L = 49,5$ nm, y nanoconchas $D_{centro} = 120$ nm (sílice), $D_{concha} = 150$ nm (oro). El contraste térmico ($\Delta T_{señal}$) y las concentraciones de nanopartículas se normalizaron. Utilizando esta normalización, las nanobarras de oro era aproximadamente un orden de magnitud más eficaz en la generación de calor que las nanoesferas y nanoconchas de oro (inserción Fig. 7A). Además, los LFA actuales (es decir, las membranas de nitrocelulosa con un material de armazón espeso) absorben cantidades significativas de energía láser (a 532 nm) creando un calor de fondo o ruido. Por lo tanto, el uso de materiales de armazón de baja absorción (es decir, de transmisión alta o reflectantes), tales como plástico o cristal, permite el uso de un láser de mayores intensidades (I). Absorción del sustrato: Se irradiaron una varilla blanca y un cubreobjetos de plástico y de cristal con un láser a 532 nm durante 1 minuto cada uno. Se midió el cambio de temperatura durante la irradiación con el láser por una cámara de infrarrojos y se determinó el cambio de temperatura máximo. (Véase la Fig. 7B) combinando nanopartículas de absorción más alta y materiales de armazón del LFA de baja absorción se puede aumentar la sensibilidad. Hay que señalar que la nanobarra de oro puede absorber más eficazmente a diferentes longitudes de onda que las nanoesferas de oro.

25 Se puede producir un aumento adicional de 1000 veces en el contraste térmico aumentando la densidad de potencia 100 veces (es decir, un aumento en la potencia del láser de 0,01 a 1 W) y utilizando una nanopartícula con un aumento de absorción (C_{abs}) de 10 veces. Se pueden utilizar mayores potencias de láser reduciendo la absorción de fondo tratada anteriormente.

30 La sensibilidad analítica de los ensayos se puede mejorar aproximadamente 10.000 veces, considerando la mejora de unas 10 veces demostrado y la mejora de 1000 veces predicha anteriormente sobre los procedimientos de detección visual utilizando las modificaciones descritas en el presente documento.

Ejemplo 4 – Detección de hCG

Se ensayó la presencia de hCG (ensayo de gestación) en una muestra utilizando un LFA con las GNP. El LFA de hCG se adquirió en Fisher Scientific (Sure-Vue Serum/kit de ensayo de hCG en orina).

35 Como se muestra en la Fig. 8A y la Fig. 8B, el contraste térmico presentaba un aumento de la sensibilidad a la presencia de hCG con respecto a la detección visual. El uso de contraste térmico presentaba un aumento de 20 veces en el límite de detección.

Ejemplo 5 – Detección de malaria

40 También se ensayó la presencia de antígeno de malaria utilizando un LFA con las GNP. El LFA de malaria se adquirió en Alere Inc. (ensayo de malaria BinaxNOW™).

Como se muestra en la Fig. 9, el contraste térmico presentaba un aumento de sensibilidad a la presencia de antígeno de malaria con respecto a la detección visual. El uso de contraste térmico presentaba un aumento de 8 veces en el límite de detección.

Ejemplo 6 – Detección de TB

45 Se ensayó la presencia de TB utilizando un LFA con GNP. El LFA de TB fue fabricado por Alere Inc. (Determine™ TB LAM ensayo rápido). Los resultados se muestran en la Tabla 1. El contraste térmico detecta una mayoría de los LFA de TB negativos visualmente (es decir, falsos negativos) basándose en la referencia convencional de un cultivo de esputo.

50

TABLA 1

Procedimiento	Relación detectada	Porcentaje detectado
TB-LAM LFA - visual	0/39	0
TB-LAM LFA - térmico	22/39	56
Cultivo de esputo	39/39	100

Se habla directamente de un aumento de sensibilidad ya que el contraste térmico reduce los resultados falsos negativos del ensayo.

Ejemplo 7 – Uso de la Tasa de Absorción Específica para hCG

5 Este experimento se llevó a cabo para ver si ese podía llevar a cabo el contraste térmico utilizando la tasa de absorción específica (SAR). Se llevó a cabo el contraste térmico de los Ejemplos 1-7 basándose en el ΔT . La SAR se basa en la pendiente inicial del cambio de temperatura.

10 La Fig. 10A muestra el cambio de temperatura durante un periodo de tiempo extenso. La Fig. 10B ilustra el cambio de temperatura en los primeros 20 segundos. Como se muestra en la Fig. 10A y Fig. 10B, el contraste térmico se puede llevar a cabo calculando la SAR. Esto hacía posible la medición en un momento temprano para minimizarla interferencia. Específicamente, la adición de calor en el tiempo da lugar a la difusión en un material. Se puede añadir calor muy rápidamente dicha difusión se minimiza, entonces la tasa de cambio de temperatura se relaciona completamente con la SAR (o Q en la Ecuación 1) y por lo tanto se puede capturar más directamente la presencia de las GNP y por tanto del antígeno en el ensayo. Esto puede permitir el uso de un láser pulsado. La Fig. 11 ilustra los resultados de un experimento utilizando hCG como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4 excepto que se determinó la SAR en vez del cambio de temperatura. Como se puede ver, la SAR se puede utilizar para la detección de analitos sin pérdida de sensibilidad y precisión.

Ejemplo 8 – Uso de partículas monodispersas

20 Se fabricaron las nanopartículas como se describe en el Ejemplo 1 utilizando el procedimiento de Frens y se analizó su dispersión.

Como se puede ver en la Fig. 12A, Fig. 12B, y Fig. 12C, las GNP sintetizadas se dispersan más uniformemente que las GNP en las varillas.

25 La Figura 13 es una cuantificación de los resultados que se ven en imágenes TEM de la Figura 12. Específicamente, se añade el recuento de GNP de diferentes tamaños y el gráfico ilustra que hay una distribución mucho más amplia en las varillas existentes vs. las sintetizadas por el procedimiento de Frens.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones preferidas, los expertos en la técnica reconocerán que se pueden realizar cambios en la forma y los detalles sin apartarse del espíritu y el ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de analitos en una muestra que comprende

exponer la región de ensayo (114) de una tira de ensayo (100) en un sistema de ensayo a una señal de energía (120) aplicada por una fuente de energía (220) después de poner en contacto la tira de ensayo (100) del sistema de ensayo con una muestra, en la que la muestra se mueve a través de la tira de ensayo (100) mediante acción capilar, comprendiendo el sistema de ensayo nanopartículas conjugadas con la molécula de unión al analito que se unen al analito en la muestra y una región de ensayo (114) que comprende moléculas de captura; y medir la respuesta térmica a la señal energética aplicada generada en la región de ensayo (114) por un sensor (122) y analizar una pendiente y un nivel máximo de respuesta térmica para detectar la presencia o ausencia del analito en la región de ensayo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las nanopartículas son de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 200 nm, en particular, entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 80 nm.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las nanopartículas comprenden nanoesferas, nanobarras, nanoconchas y combinaciones de los mismos.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el analito detectado es CrAg, antígeno de Tb, hCG, antígeno de malaria o combinaciones de los mismos, en particular, en los que los diferentes analitos se detectan en un sistema de ensayo.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es sangre, orina, saliva, plasma o combinaciones de los mismos.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el sensor (122) es un sensor térmico y proporciona un resultado cuantitativo del analito presente en la muestra.
7. Un kit de ensayo que comprende

un sistema de ensayo que comprende una almohadilla de muestra (102), una tira de ensayo (100), nanopartículas conjugadas con una molécula de unión a analito, una región de ensayo (114) que comprende moléculas de captura, una región de control (116) y una almohadilla absorbente (108) configurada para la comunicación fluida cuando se aplica una muestra; y un lector de ensayo de contraste térmico (200) que comprende una fuente de energía (220), un microprocesador (300) y un sensor (122); en el que la región de ensayo (114) está configurada para ser expuesta a una señal energética (120) aplicada por la fuente de energía (220); en el que el sensor (122) está configurado para medir la respuesta térmica a la señal energética aplicada (120) generada en la región de ensayo (114); y en el que el microprocesador (300) está configurado para analizar una pendiente y un máximo nivel de respuesta térmica con el fin de detectar la presencia o ausencia de un analito en la región de ensayo.
8. El kit de la reivindicación 7 en el que las nanopartículas comprenden plata, grafeno, oro y combinaciones de los mismos.
9. El kit de la reivindicación 7 en el que las nanopartículas comprenden nanoesferas, nanobarras, nanoconchas y combinaciones de los mismos.
10. El kit de la reivindicación 7 en el que las nanopartículas son de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 200 nm, en particular, entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 80 nm.
11. El kit de la reivindicación 7 en el que el analito es CrAg, antígeno de Tb, hCG, antígeno de malaria, Strep A, Staph, STD, *P. falciparum*, panel de fiebre o combinaciones de los mismos, en particular, en el que se detectan múltiples analitos diferentes en un sistema de ensayo.
12. El kit de la reivindicación 7 en el que la muestra es sangre, plasma, orina, saliva o combinaciones de los mismos.
13. El kit de la reivindicación 7 en el que las moléculas de captura de la región de ensayo son las mismas que las moléculas de unión al analito.
14. El kit de la reivindicación 7 en el que las moléculas de captura de la región de ensayo son diferentes de las moléculas de unión al analito conjugadas con las partículas.
15. El kit de la reivindicación 7 en el que el sistema de contraste térmico proporciona una cantidad cuantitativa del analito presente en la muestra.

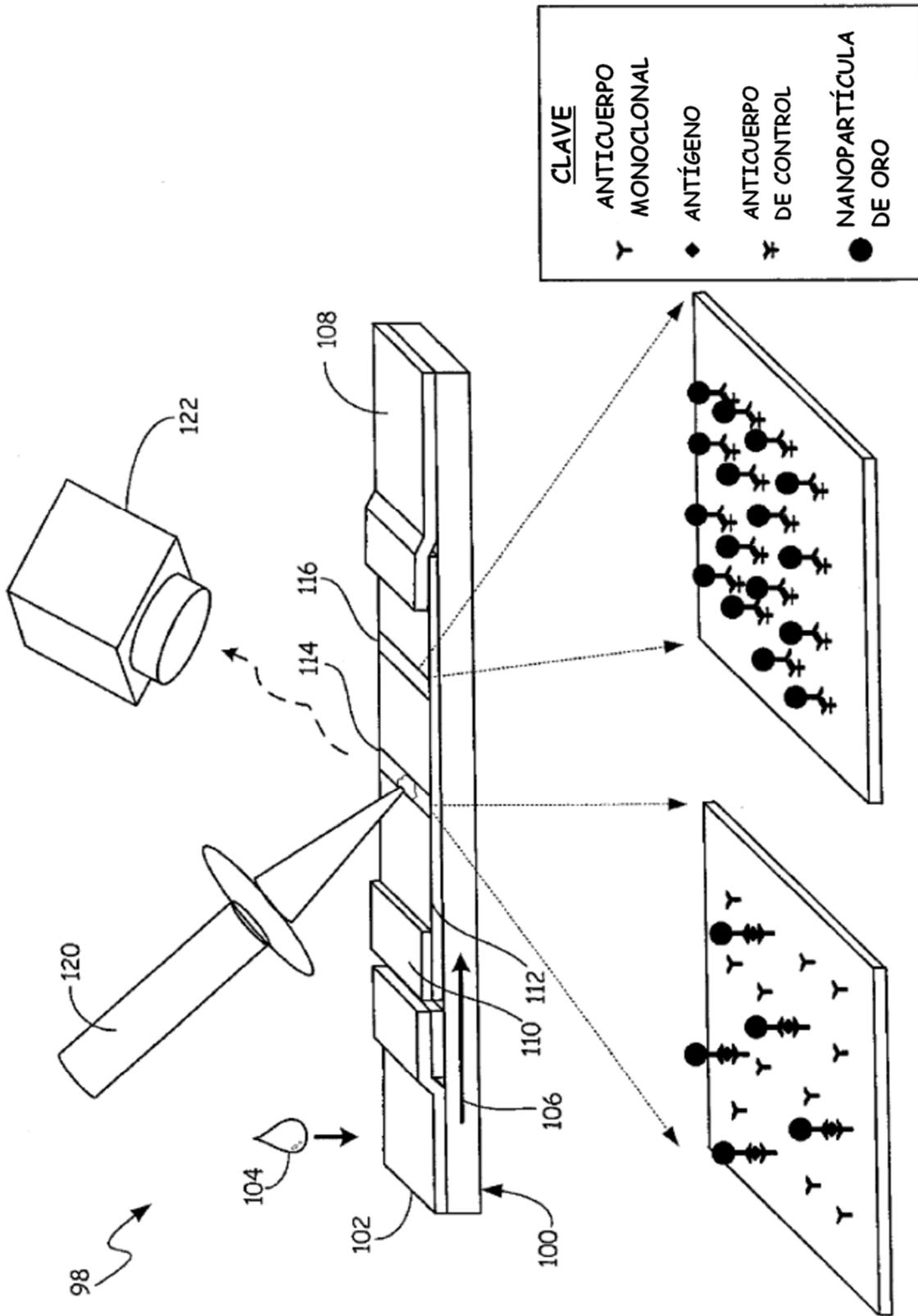


FIG. 1

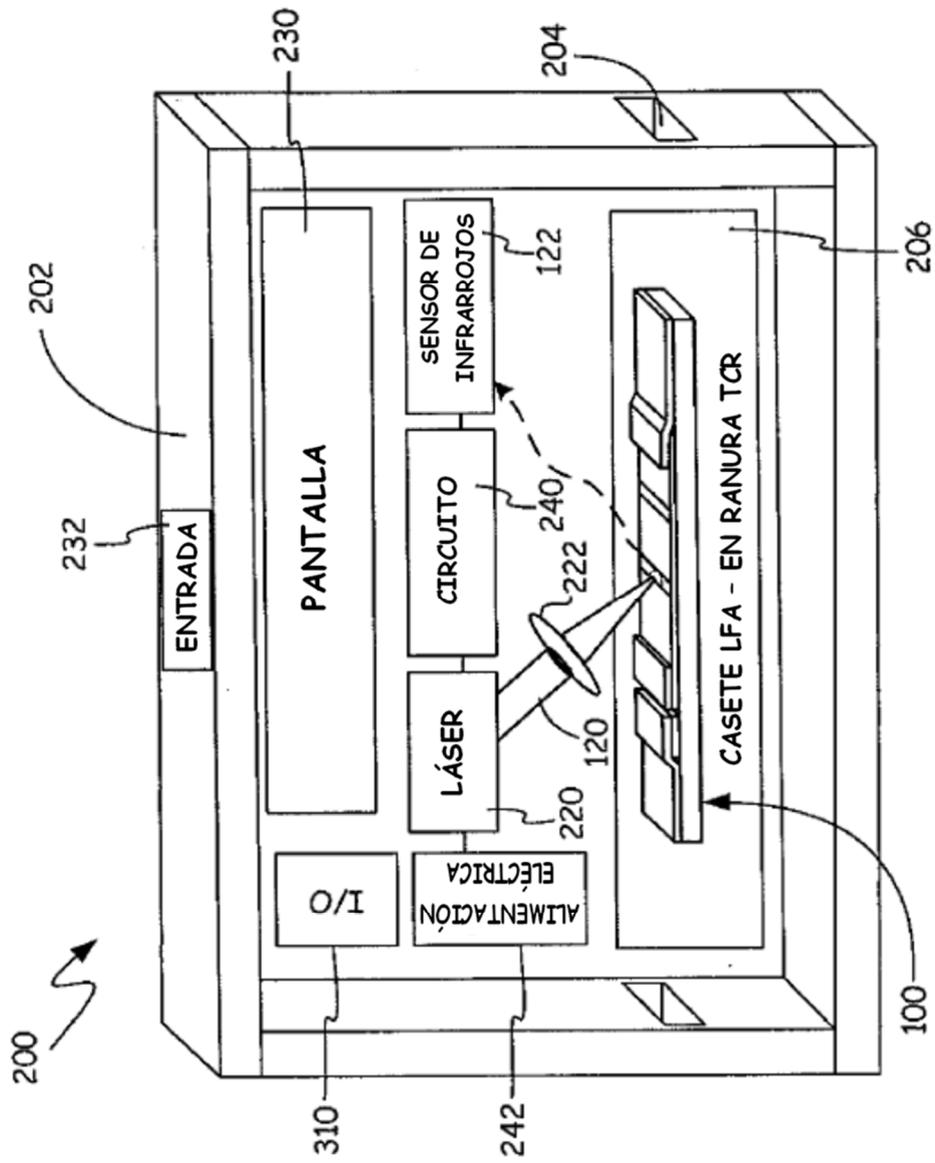


FIG. 2A

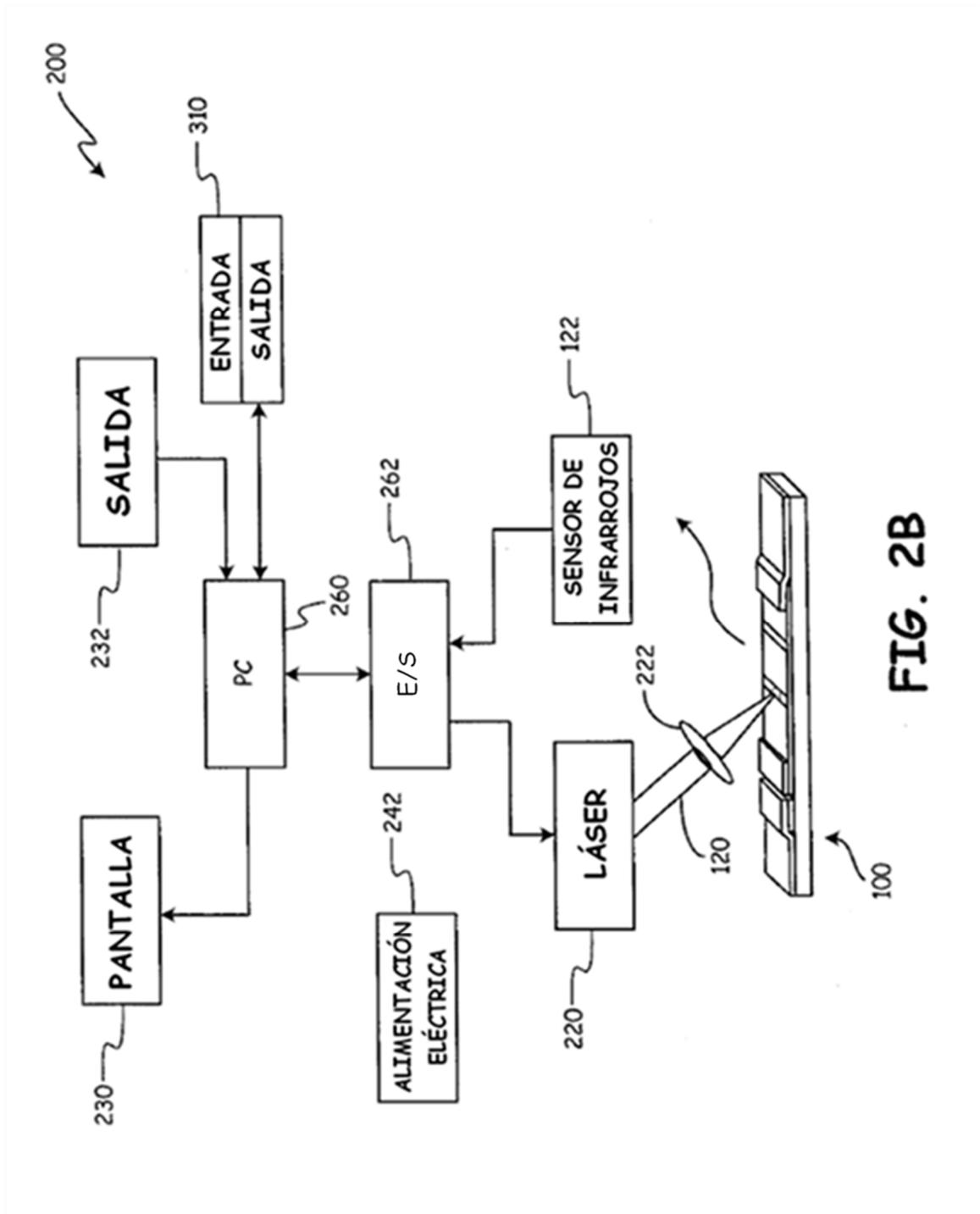


FIG. 2B

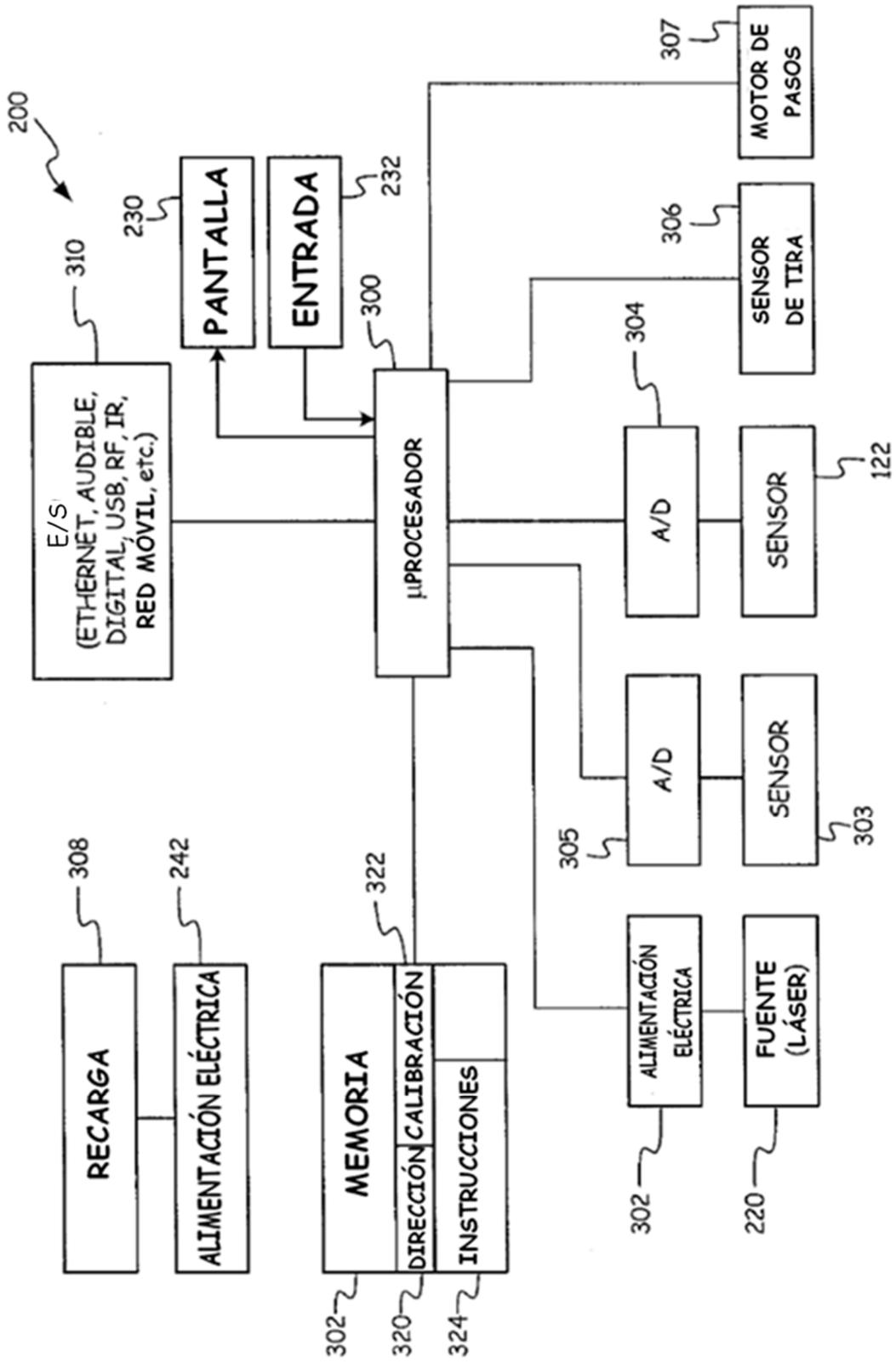


FIG. 3

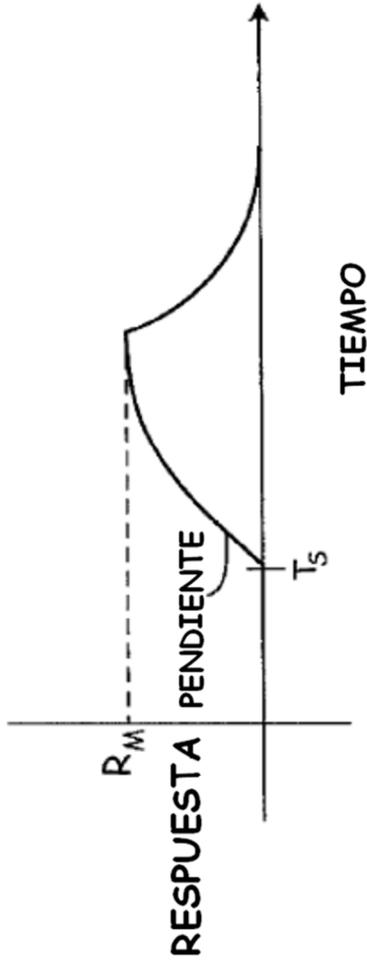


FIG. 4A

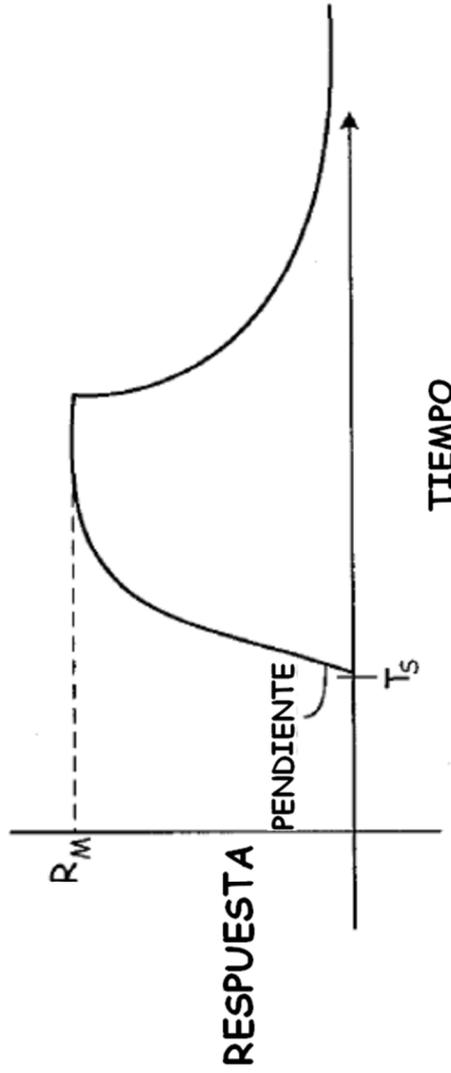


FIG. 4B

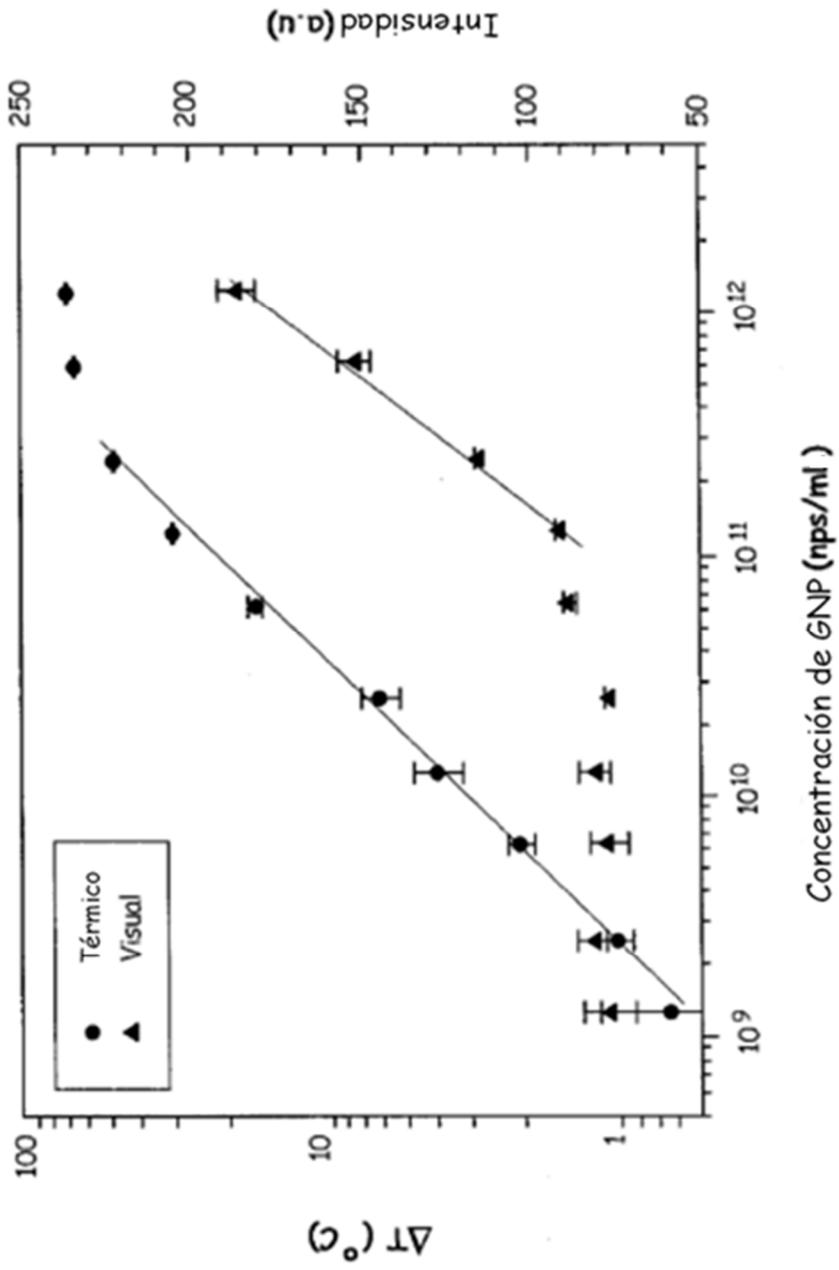


FIG. 5

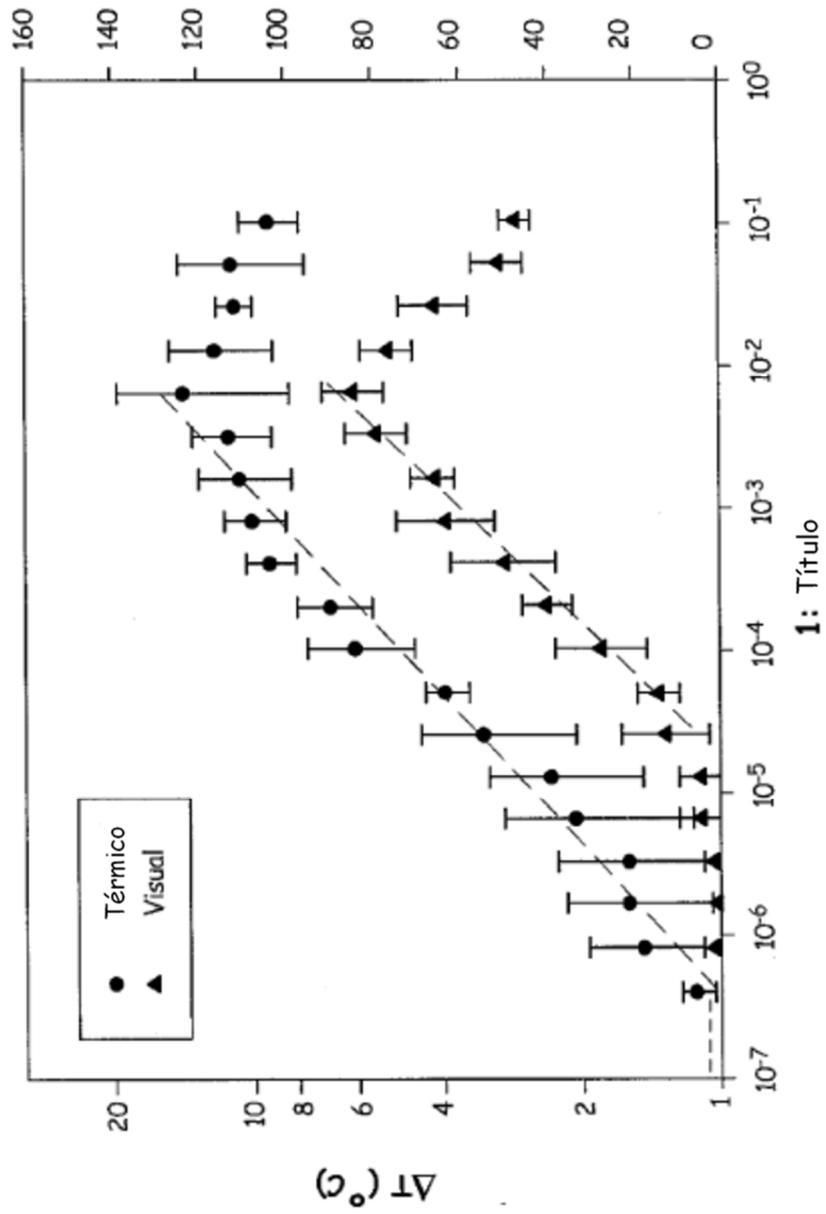


FIG. 6

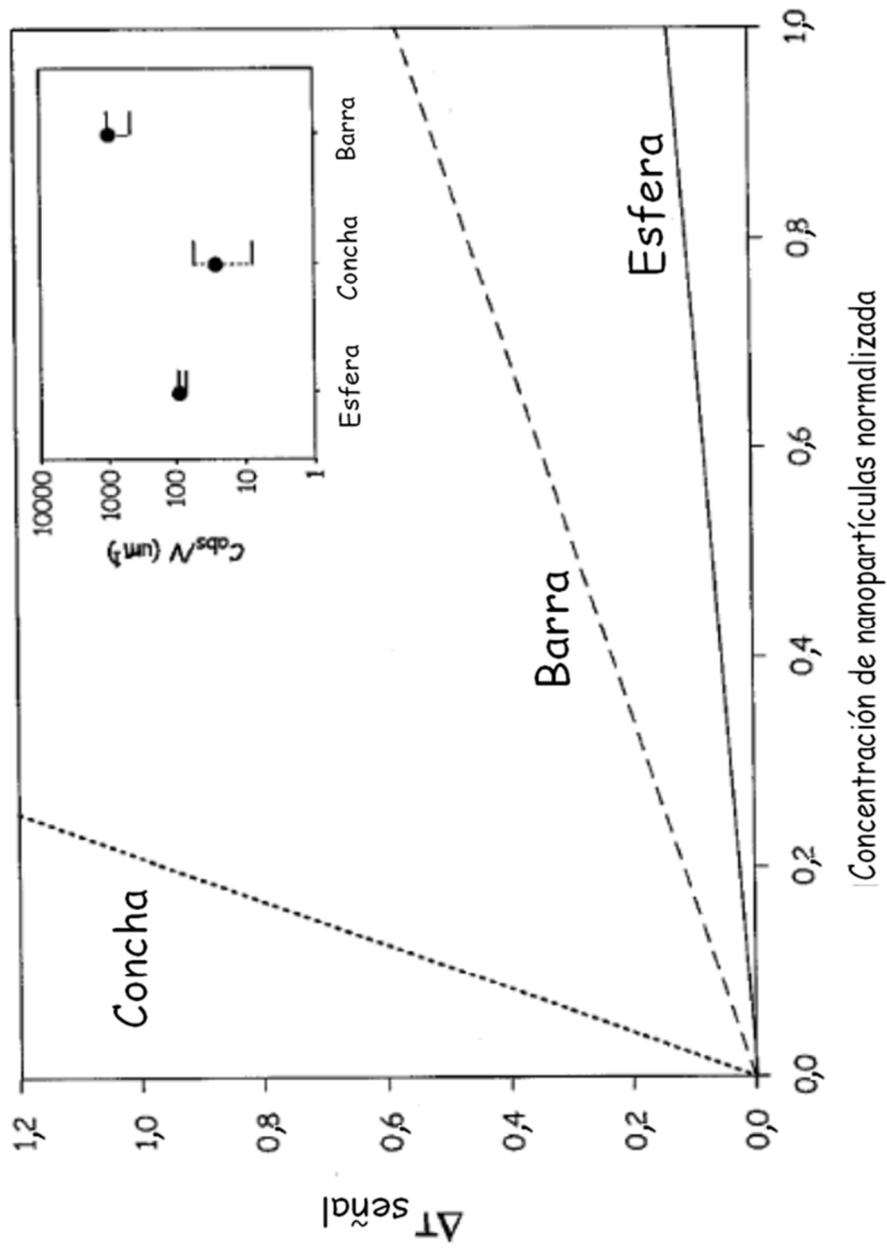


FIG. 7A

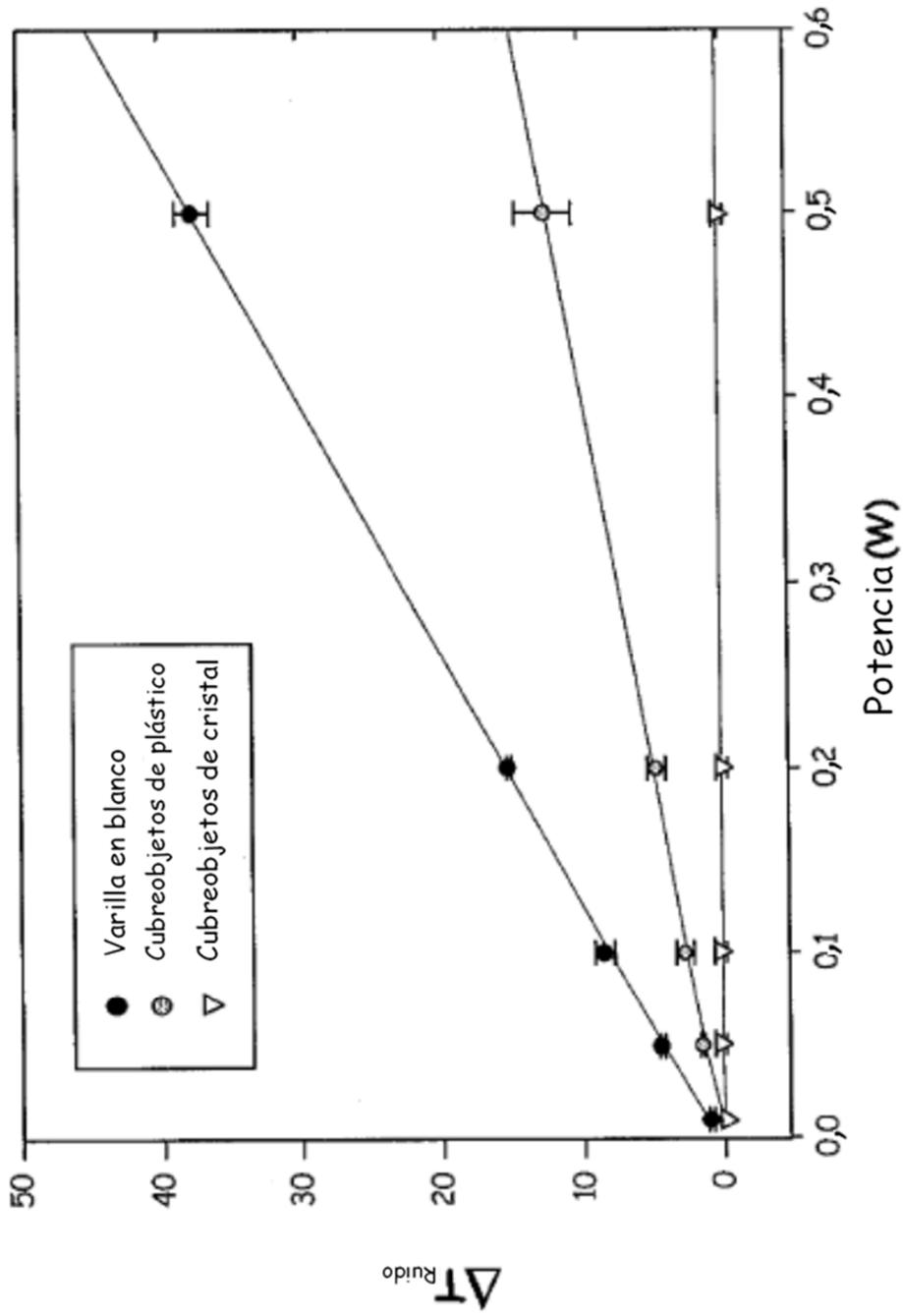


FIG. 7B

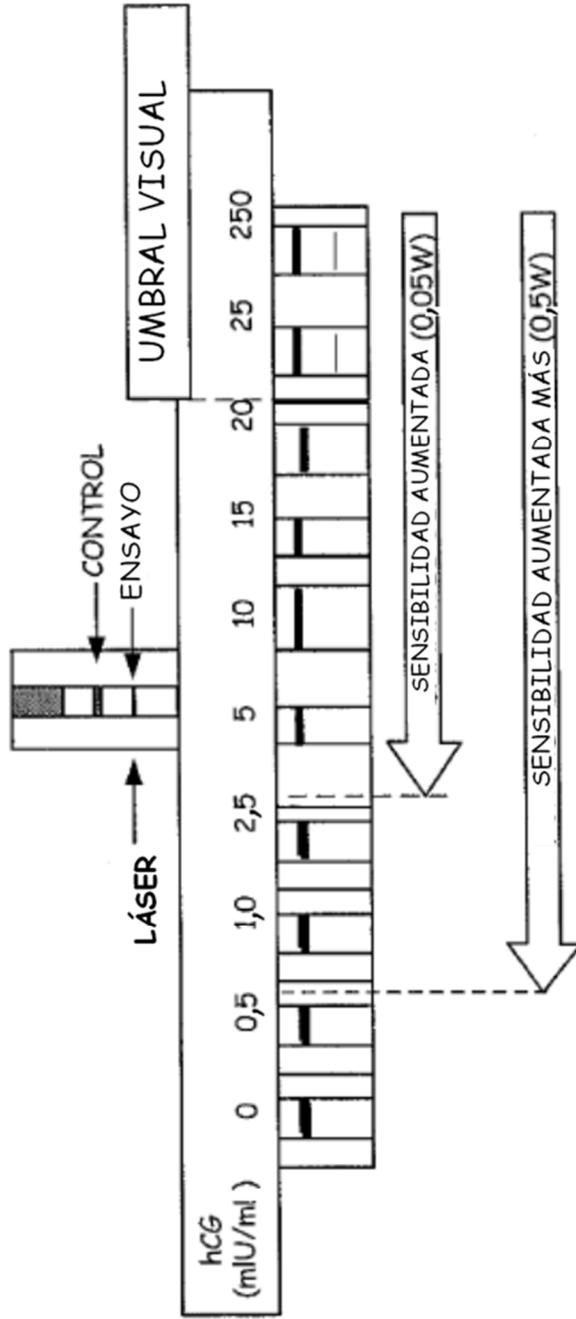
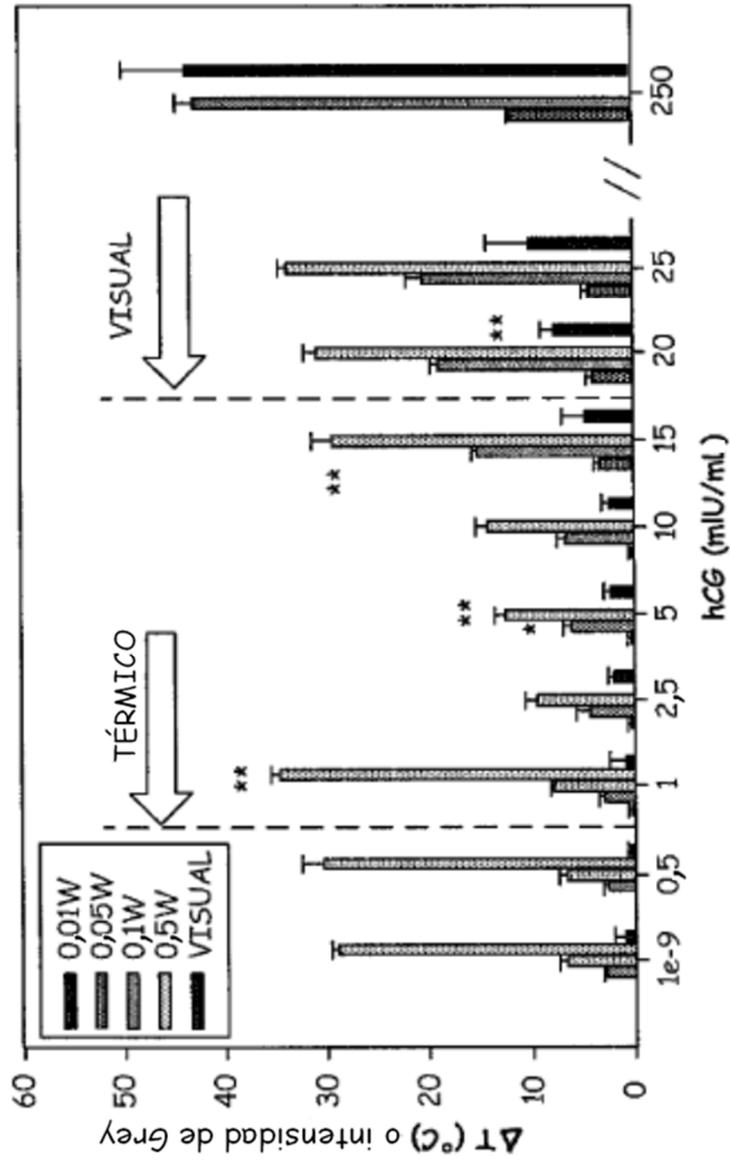


FIG. 8A



Significación estadística (vs. hCG=)

* p < 0,01

** p < 0,005

FIG. 8B

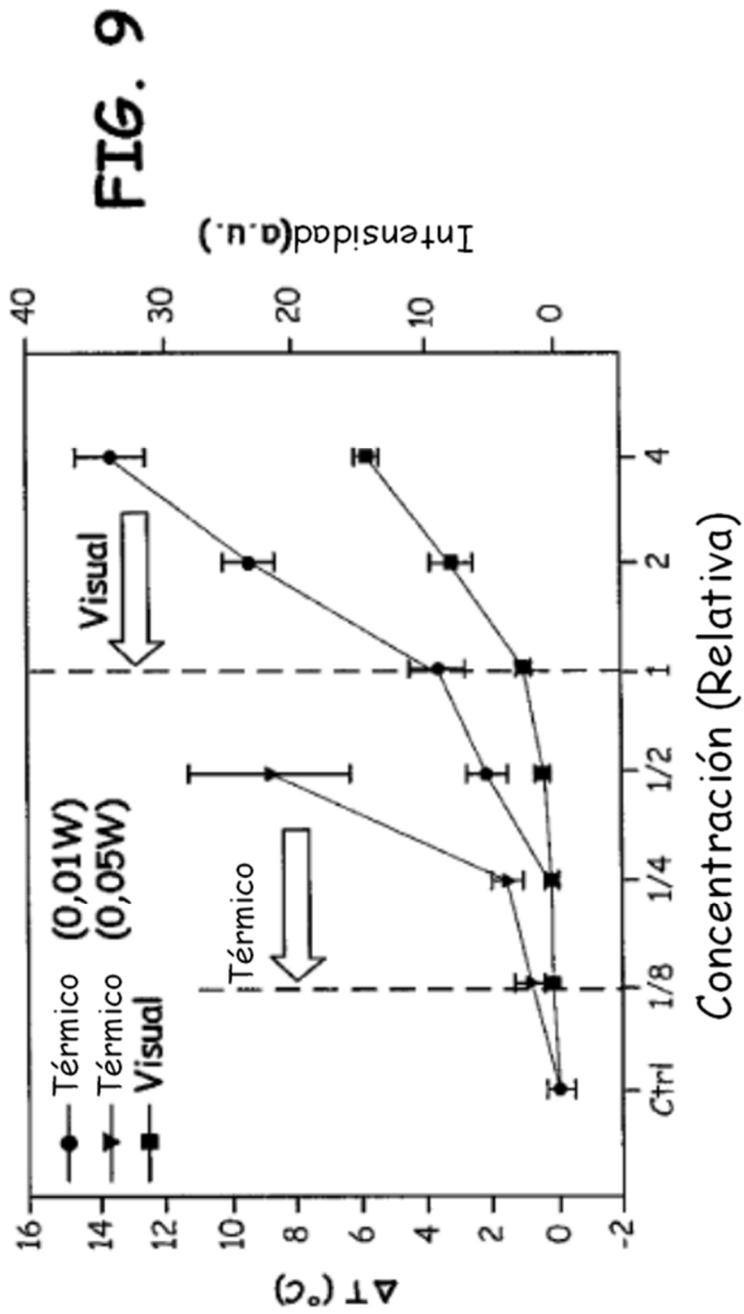


FIG. 10A

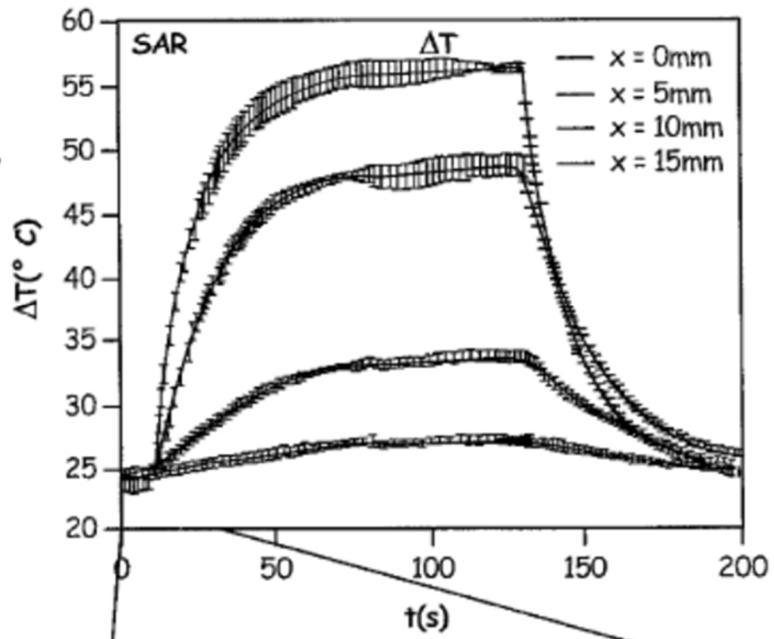
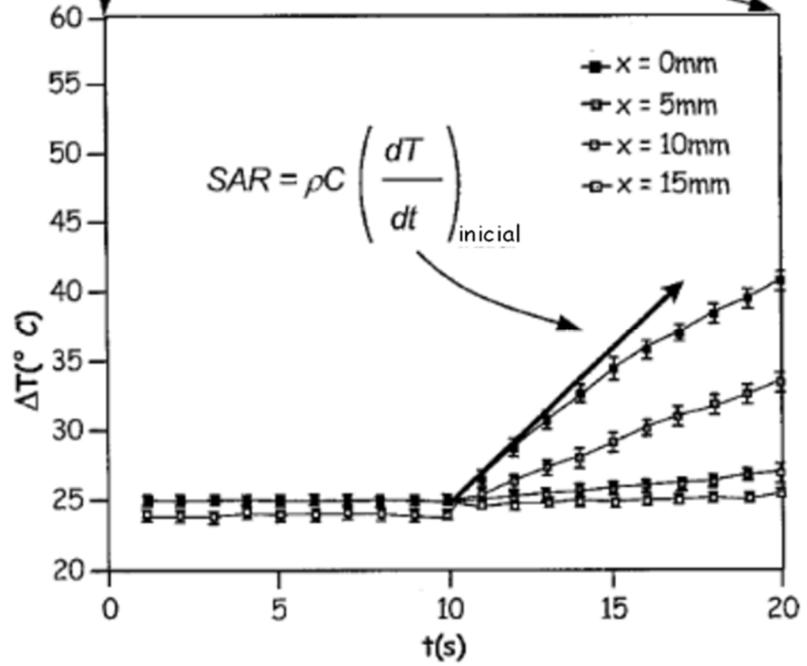


FIG. 10B



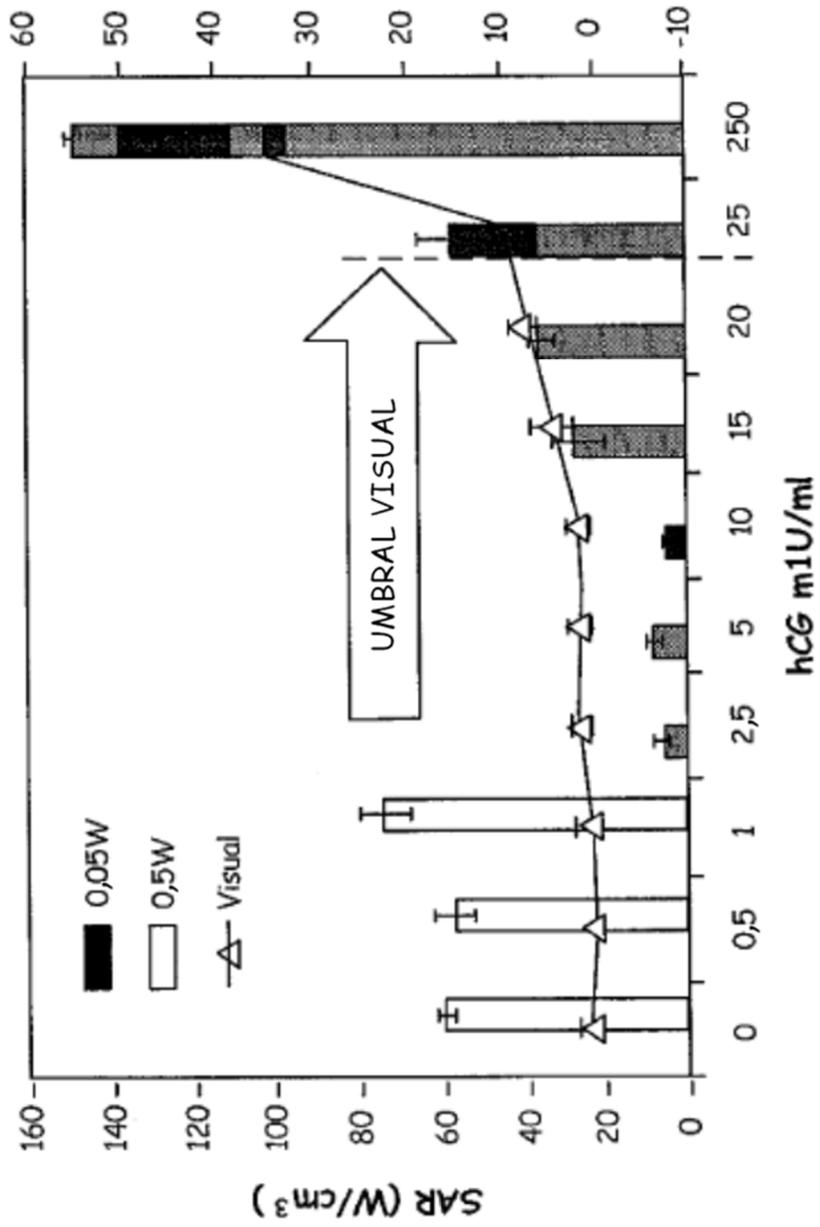
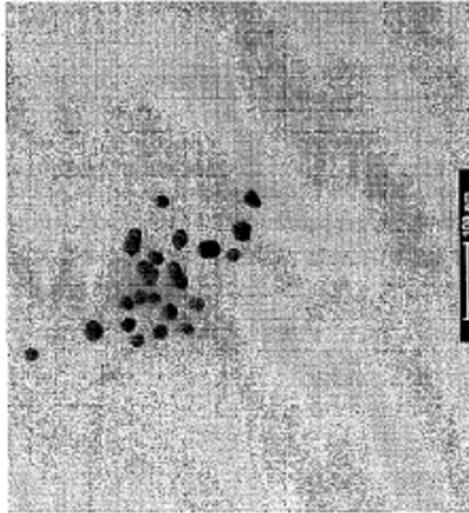


FIG. 11

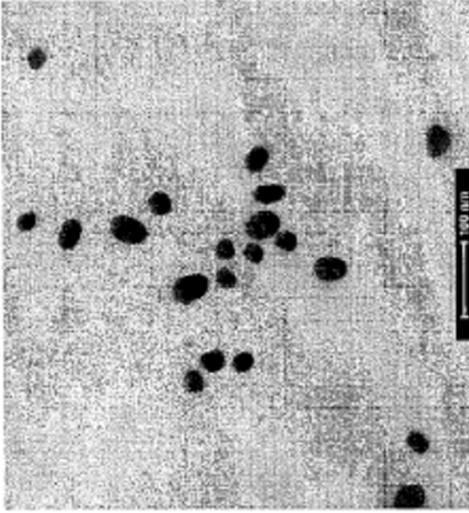
Varilla CM*



D=25,3nm ($\pm 5,5$ nm)

FIG. 12A

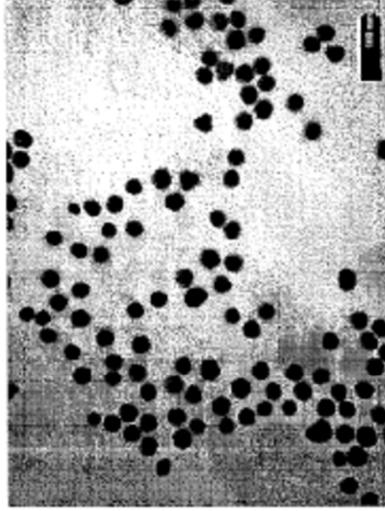
Varilla hCG



D=32,2nm ($\pm 6,4$ nm)

FIG. 12B

Sintetizado



29,8nm ($\pm 2,9$ nm)

FIG. 12C

*CM: meningitis criptocócica

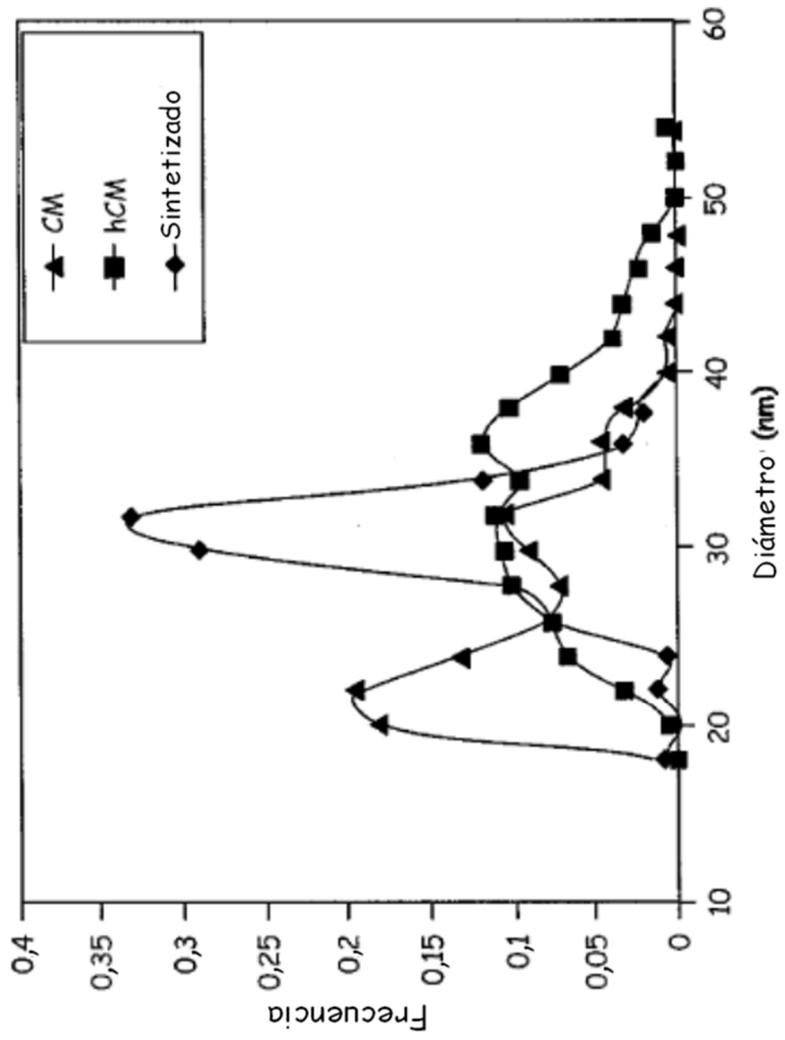


FIG. 13