

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 272**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2008 E 08736903 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2142929**

54 Título: **Dispositivo de ensayo**

30 Prioridad:

10.04.2007 GB 0706906

01.09.2007 GB 0717043

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

16.01.2014

73 Titular/es:

ALERE SWITZERLAND GMBH (100.0%)

BAHNHOFSTRASSE 28

6300 ZUG, CH

72 Inventor/es:

RAJ, BALBIR;

EAPEN, SAJI y

LINLEY, EZRA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 438 272 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de ensayo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo de ensayo, un kit y un procedimiento para determinar la presencia o el nivel de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en un amplio intervalo de concentraciones.

10 **Antecedentes de la invención**

Se han desarrollado y comercializado sencillos dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral para la detección de analitos en muestras líquidas, véase, por ejemplo, el documento EP 291194. Tales dispositivos comprenden típicamente un soporte poroso que comprende un reactivo de unión marcado movilizable seco, capaz de unirse al analito en cuestión, y un reactivo de unión inmovilizado, también capaz de unirse al analito, proporcionado en una zona de detección posterior al reactivo de unión marcado. La detección del reactivo de unión marcado inmovilizado en la zona de detección proporciona una indicación de la presencia del analito en la muestra.

Alternativamente, cuando el analito de interés es un hapteno, el dispositivo de inmunoensayo puede emplear una reacción de competición, en la que un analito o un análogo del analito marcados compiten con el analito presente en la muestra por un reactivo de unión inmovilizado en la zona de detección. Alternativamente, el dispositivo de ensayo puede emplear una reacción de inhibición, en el que se proporcionan un analito o un análogo del analito inmovilizados en una zona de detección y el dispositivo de ensayo comprende un reactivo de unión marcado movilizable para el analito.

Frecuentemente, el ensayo elegido para la detección de analitos es un inmunoensayo de sándwich. Sin embargo, un ensayo de sándwich no siempre es posible, por ejemplo, en el caso de moléculas pequeñas como haptenos, que pueden no tener el tamaño suficiente para permitir su unión simultánea a dos parejas de unión diferentes. Una curva de respuesta a la dosis preparada con un dispositivo de flujo lateral típico y el empleo de un inmunoensayo de sándwich muestra niveles crecientes de la señal con el aumento del analito hasta el punto de que, para niveles más elevados del analito, la curva tiende a aplanarse. Para niveles aún mayores del analito, la señal comienza a disminuir debido a la captura preferente en la zona de detección del analito que todavía no se ha unido al reactivo marcado. Este fenómeno se conoce como el efecto de gancho. Por lo tanto, los inmunoensayos de sándwich presentan un intervalo de ensayo limitado debido a que la cantidad o la intensidad de la señal observada para mayores niveles del analito puede ser igual o incluso inferior a la observada para menores niveles del analito.

Un ensayo de competición o de inhibición proporciona típicamente una señal elevada para niveles altos o bajos del analito. Para niveles crecientes del analito, el nivel de la señal puede ser todavía elevado, dependiendo de la cantidad de la especie de unión marcada presente en comparación con la cantidad de analito. Para niveles todavía crecientes del analito, la señal comienza a disminuir, a medida que el analito sin unir compite con el analito o el análogo del analito marcados por el reactivo de unión inmovilizado o se une al reactivo de unión marcado y disminuye la unión del reactivo de unión marcado en la zona de detección.

Por lo tanto, el uso de ensayos de sándwich para medir un analito en un amplio intervalo puede presentar problemas con respecto al efecto de gancho. Elevadas concentraciones del analito comienzan a producir una disminución de la señal del ensayo. Los ensayos de competición o de inhibición resultan en la reducción de la señal del ensayo para elevadas concentraciones del analito y, por lo tanto, ofrecen un intervalo limitado para poder medir el analito.

Por lo tanto, los procedimientos de ensayo anteriores no son adecuados para medir las concentraciones de un analito en un amplio intervalo.

El documento US 2005/0112780 desvela un dispositivo de ensayo y un procedimiento para extender el intervalo de detección dinámica de los dispositivos de ensayo que comprende un soporte poroso que permite el paso de flujo y que comprende una zona de detección y una zona de compensación posterior a la zona de detección. La detección implica un primer reactivo de unión que se une a una sonda de detección para generar una señal de detección con una intensidad proporcional a la cantidad de analito y la zona de compensación comprende un segundo reactivo de captura que se une a una sonda de detección para generar una señal que es inversamente proporcional a la intensidad de la señal de detección. El ensayo puede comprender además una tercera zona de calibración que genera una señal. El primer reactivo de unión puede seleccionarse de un grupo que incluye un antígeno, un hapteno o estreptavidina. Los reactivos primero y segundo de unión pueden elegirse entre una serie de especies que incluyen un antígeno, un hapteno o estreptavidina.

El documento US 2005/0112779 desvela un dispositivo de ensayo de paso de flujo con dos zonas de detección en una única vía de flujo en una única tira de ensayo: una de las zonas de detección participa en un ensayo de tipo competitivo y la otra participa en un ensayo de tipo sándwich, en el que la combinación de los tipos de ensayo permite la detección de un analito en un amplio intervalo de concentraciones.

5 El documento EP 0465266 desvela un dispositivo de ensayo con varias regiones de detección del analito localizadas en una única vía de flujo. De nuevo, una zona de detección es para usar en un ensayo de tipo competitivo y otra zona de detección es para usar en un ensayo de tipo sándwich. De nuevo, la finalidad indicada es la medida de un analito en un amplio intervalo de concentraciones.

10 El documento WO 97/06439 desvela un ensayo de flujo lateral que implica el uso de miembros de un par de unión específico que no guarda relación con una interacción entre analito y antianalito. El ensayo implica una única vía de flujo.

15 El documento US 2003/207465 desvela un dispositivo de ensayo de flujo lateral con reactivos de unión específica, marcados y sin marcar, que son capaces de participar en un ensayo de sándwich o en un ensayo de competición y en el que, antes de llevar a cabo el ensayo, el reactivo de unión específica marcado queda retenido en un cuerpo macroporoso. El dispositivo tiene solo una vía de flujo.

20 El documento US 2006/024842 desvela un kit de múltiples dispositivos de prueba de flujo lateral, diseñados para determinar el nivel relativo de la hCG en muestras de una mujer embarazada y, de este modo, indicar si los niveles de la hCG aumentan de la manera esperada (y confirmar así que el embarazo evoluciona satisfactoriamente). Cada uno de los dispositivos de prueba tiene varias vías de flujo, cada una de las cuales tiene como objetivo la medida de la hCG en un intervalo de concentraciones concreto diferente, de modo que el dispositivo en su conjunto puede medir la hCG en un intervalo de concentraciones más amplio de lo que es posible con un único dispositivo de ensayo convencional.

25 El documento US 2004/0197820 desvela un dispositivo de ensayo con un soporte poroso que permite el paso de flujo para reducir el efecto de gancho que comprende una zona de detección, en el que el dispositivo puede incluir una zona de calibración posterior.

30 El dispositivo US 2006/0019404 desvela un dispositivo de ensayo con un amplio intervalo dinámico que comprende una tira de prueba de flujo lateral que comprende varias de zonas de detección con una sensibilidad progresivamente decreciente a la concentración del analito. El dispositivo de ensayo puede comprender dos soportes, cada uno de los cuales tiene varias zonas de detección. Para determinar la concentración del analito, se detecta la cantidad de marcador o señal presente en las múltiples zonas de detección.

35 El documento EP 462376 desvela un dispositivo de ensayo que comprende un sitio de captura y un sitio de recuperación del conjugado, en el que el sitio de recuperación del conjugado recibe y se une a dicho conjugado o complejos conjugados que migran a través de dicho sitio de captura y en el que, para determinar la cantidad del analito de interés, se detecta el conjugado inmovilizado en el sitio de recuperación y en el sitio de captura.

40 Los presentes inventores han demostrado que, para dispositivos de ensayo en los que se proporcionan múltiples zonas de detección para la detección de un analito en el mismo soporte poroso, la unión en una zona de detección anterior puede cambiar las características de unión en una zona de detección posterior y que cualquier variación de la unión en una zona de detección anterior puede causar una variación compuesta de la unión en una zona de detección posterior. Esto es especialmente válido para niveles mayores de concentración del analito y puede dar lugar a poca precisión en el ensayo. Además, se ha encontrado que puede producirse una unión cruzada entre los respectivos reactivos de unión presentes en las zonas de detección durante la realización de la prueba y también se ha observado una unión cruzada durante la fabricación de los dispositivos y mientras estos se almacenan en estado seco. Se ha demostrado que esto afecta a los niveles de precisión y sensibilidad del ensayo. No parece que estos problemas se hayan reconocido previamente en la técnica anterior.

50 Un objetivo es proporcionar un dispositivo de ensayo, un kit y un procedimiento mejorados para ampliar el intervalo de concentraciones del analito de un ensayo para la hCG.

Sumario de la invención

55 De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un dispositivo de ensayo para la determinación de la hCG en una muestra líquida en un amplio intervalo de concentraciones según se define en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas a este documento.

60 El dispositivo tiene un primer ensayo para la hCG y un segundo ensayo para la hCG. El primer ensayo proporciona una indicación del nivel del analito en un primer intervalo de concentraciones y el segundo ensayo proporciona una indicación del nivel del analito en un segundo intervalo de concentraciones más elevadas.

65 Los intervalos primero y segundo de concentraciones difieren entre sí, pero los intervalos primero y segundo de concentraciones se pueden solapar para proporcionar un intervalo de concentraciones continuo.

El dispositivo de ensayo es capaz de proporcionar una indicación del nivel de analito con respecto a dos o más

umbrales y de proporcionar una indicación del nivel de analito por debajo o por encima de varios umbrales. Por ejemplo, el número de umbrales puede ser dos, tres, cuatro, cinco o superior. El dispositivo de ensayo comprende dos o más valores umbral almacenados, en el que cada valor almacenado corresponde a un nivel del analito.

5 Los ensayos primero y segundo pueden proporcionar, separada o conjuntamente, una indicación del nivel del analito dentro de un cierto intervalo.

10 El primer ensayo proporciona una indicación del nivel del analito inferior o igual a un primer umbral y el segundo ensayo proporciona una indicación del nivel del analito por encima de un tercer umbral. Los ensayos primero y segundo pueden proporcionar conjuntamente una indicación del nivel del analito superior o igual al primer umbral pero inferior al tercer umbral.

15 Puede proporcionarse un reactivo de unión para el analito o un análogo del analito en forma inmovilizada en una zona de detección. El reactivo de unión puede elegirse entre un reactivo de unión para el analito de interés, un analito o un análogo del analito, dependiendo de si el ensayo es un ensayo de tipo sándwich o un ensayo de tipo competitivo. De manera similar, el reactivo de unión marcado puede comprender un reactivo de unión marcado para el analito de interés, un analito marcado o un análogo del analito marcado.

20 Alternativamente, puede proporcionarse un reactivo en forma inmovilizada en una zona de detección, que es capaz de unirse a un complejo entre el reactivo de unión marcado, el analito y un segundo reactivo de unión. Por ejemplo, el segundo reactivo de unión puede proporcionarse en forma movilizable y puede estar conjugado o unido de otra manera a una especie de unión como biotina, en el que el reactivo inmovilizado en la zona de detección es una pareja de unión complementaria como estreptavidina o antibiotina, de modo que se forma un complejo entre el complejo entre el reactivo de unión marcado, el analito y el segundo reactivo de unión y biotina y estreptavidina en la zona de detección.

Los ensayos primero y segundo comprenden un reactivo de unión marcado en forma movilizable, anterior las zonas de detección respectivas de los ensayos primero y segundo en el estado seco, antes del uso del dispositivo.

30 Los ensayos primero y segundo pueden comprender además un reactivo de unión sin marcar inmovilizado en cada zona de detección.

35 El dispositivo de ensayo puede comprender más de dos ensayos, cada uno de los cuales es capaz de detectar el analito en un intervalo de concentraciones concreto, por encima o por debajo de uno o más umbrales.

Los ensayos primero y segundo pueden proporcionar, individual o conjuntamente, una indicación del nivel concreto del analito o de si el analito se encuentra por encima o por debajo de un umbral determinado.

40 El dispositivo de ensayo puede tener una región común de aplicación de muestras que conecta fluidicamente las diversas vías de flujo. De este modo, una muestra líquida aplicada en la región común de aplicación de muestras del dispositivo es capaz de desplazarse a lo largo de las vías de flujo de los ensayos respectivos a las zonas de detección respectivas.

45 Como una alternativa a proporcionar los ensayos primero y segundo en un único dispositivo de ensayo, los ensayos pueden proporcionarse como dispositivos de ensayo independientes, en el que los resultados de los dispositivos respectivos tomados conjuntamente son capaces de proporcionar una indicación o medida del nivel del analito.

50 Se sabe que el nivel del analito varía en función del tiempo, de modo que el dispositivo de ensayo proporciona al usuario una indicación de base temporal, como la edad gestacional en unidades de días o semanas.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso del dispositivo del primer aspecto para la determinación de un embarazo, así como la edad gestacional de una mujer en unidades de semanas a partir de una muestra de orina de dicha mujer.

55 El término "vía de flujo" para los fines de esta invención se refiere a un sustrato que es capaz de transportar un líquido desde una primera posición a una segunda posición y puede ser, por ejemplo, un canal capilar, una vía microfluídica o un soporte poroso como un soporte poroso de flujo lateral. El soporte poroso puede comprender uno o varios materiales de soporte porosos que pueden superponerse en una disposición lineal o apilada o que están conectados fluidicamente. Los materiales de soporte porosos pueden ser iguales o diferentes. Las vías primera y segunda de flujo pueden proporcionarse en sustratos separados o pueden proporcionarse en un sustrato común, de modo que el líquido que se transporta a lo largo de la vía de flujo del primer ensayo no sea capaz de cruzar a la vía de flujo del segundo ensayo. Por ejemplo, los ensayos primero y segundo pueden proporcionarse en el mismo soporte poroso, de modo que las vías primera y segunda de flujo estén aisladas entre sí. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante el corte con láser de partes del soporte poroso para hacerlo no poroso, con lo que se separan las vías primera y segunda de flujo. Como otra alternativa más, las zonas primera y segunda de detección pueden proporcionarse en la misma vía de flujo en una disposición sustancialmente yuxtapuesta, de modo que ninguna es

posterior a la otra.

En particular, la vía de flujo puede comprender un soporte poroso de flujo lateral. Los reactivos de unión marcados y la zona de detección de cada ensayo pueden proporcionarse respectivamente en diferentes materiales de soporte.

5 Los materiales adecuados que pueden emplearse como soporte poroso para proporcionar la zona de detección incluyen nitrocelulosa, fibra de acetato, celulosa o derivados de celulosa, poliéster, poliolefina o fibra de vidrio. El soporte poroso puede comprender nitrocelulosa. Esto tiene la ventaja de que un reactivo de unión puede inmovilizarse firmemente sin un tratamiento químico previo. Si el material poroso en fase sólida comprende papel, por ejemplo, la inmovilización del anticuerpo en la segunda zona tiene que llevarse a cabo mediante acoplamiento
10 químico, por ejemplo, mediante CNBr, carbonildiimidazol o cloruro de tresilo.

El ensayo puede proporcionarse en forma de una tira de ensayo a lo largo de la cual fluye la muestra líquida.

15 El término "reactivo de unión" se refiere a un miembro de un par de unión, es decir, dos moléculas diferentes, en el que una de las moléculas se une específicamente a la segunda molécula por medios químicos o físicos. Las dos moléculas están relacionadas en el sentido de que la unión entre sí es tal que son capaces de distinguir a su pareja de unión de otros constituyentes del ensayo con características similares. Los miembros del par de unión específica se denominan ligando y receptor (antiligando), un miembro de un par de unión y su pareja del par de unión y similares. Una molécula puede ser también miembro de un par de unión para una agregación de moléculas; por
20 ejemplo, un anticuerpo dirigido contra un complejo inmunitario de un segundo anticuerpo y su antígeno correspondiente puede considerarse como miembro de un par de unión para el complejo inmunitario. El reactivo de unión puede comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, capaz de unirse a un antígeno.

25 Además de los miembros del par de unión antígeno y anticuerpo, otros pares de unión incluyen, como ejemplos sin limitación, biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias nucleotídicas complementarias, secuencias peptídicas complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, una secuencia peptídica y un anticuerpo específico para la secuencia o la proteína completa, ácidos poliméricos y bases, colorantes y aglutinantes de proteínas, péptidos y aglutinantes de proteínas específicos (por ejemplo, ribonucleasa, el péptido S y la proteína S de la ribonucleasa) y similares. Además, los pares de unión
30 específica pueden incluir miembros que son análogos del miembro de unión específica original.

Un "marcador", cuando se usa en el contexto de un reactivo de unión marcado, se refiere a cualquier sustancia capaz de producir una señal detectable visual o instrumentalmente. Diversos marcadores adecuados para uso en la presente invención incluyen marcadores que producen señales por medios químicos o físicos, por ejemplo, son
35 ópticamente detectables. Tales marcadores incluyen enzimas y sustratos, cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, especies electroactivas, moléculas colorantes, marcadores radioactivos y marcadores particulados. El analito mismo puede ser intrínsecamente capaz de producir una señal detectable. El marcador puede unirse covalentemente al reactivo de unión.

40 El marcador puede comprender una partícula como oro, plata, partículas no metálicas coloidales como selenio o telurio, partículas teñidas o coloreadas como una partícula de polímero que incorpora un colorante o un sol de colorante. El colorante puede ser de cualquier color adecuado, por ejemplo, azul. El colorante puede ser fluorescente. Los soles de colorantes pueden prepararse a partir de sustancias colorantes hidrófobas disponibles comercialmente como Foron Blue SRP (Sandoz) y Resolin Blue BBLs (Bayer). Los marcadores poliméricos
45 adecuados pueden elegirse entre una gama de polímeros sintéticos como poliestireno, poliviniltolueno, poliestieno-ácido acrílico y poliácroleína. Los monómeros usados son normalmente insolubles en agua y se emulsionan en un tensoactivo acuoso, de modo que se forman micelas de monómero, cuya polimerización se induce entonces por la adición de un iniciador a la emulsión. Se producen partículas de polímero sustancialmente esféricas. De acuerdo con un una realización ejemplar, el marcador es una partícula polimérica azul.

50 La muestra puede derivarse o componerse de orina.

El analito es la gonadotropina coriónica humana (hCG). El analito puede tener más de una región de unión. Por ejemplo, la hCG comprende una subunidad α idéntica a la de la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH) y una subunidad β exclusiva de la hCG. Pueden usarse anticuerpos dirigidos contra las subunidades α y β para unirse a la hCG en un formato de inmunoensayo de
55 sándwich.

60 El dispositivo de ensayo de la invención puede usarse para medir el nivel o la presencia de la hCG en un amplio intervalo de concentraciones. El intervalo puede variar desde aproximadamente 10 mUI hasta aproximadamente 250.000 mUI.

65 El dispositivo es capaz de medir la cantidad de hCG en la muestra líquida y, sobre la base de valores de referencia almacenados, indicar al usuario la edad gestacional en unidades de base temporal. El dispositivo puede indicar también la presencia o no de un embarazo, determinada según si el nivel de la hCG se encuentra por encima o por debajo de un umbral de base. Los valores de referencia y umbral se almacenan típicamente en el dispositivo como

parte de un algoritmo. El umbral de base puede variar típicamente de 10 a 25 mUI/ml.

De acuerdo con una realización, el primer ensayo puede proporcionar una indicación de la presencia de embarazo o no, sobre la base de si el nivel de la hCG detectado se encuentra, respectivamente, por encima o por debajo de un umbral de base y/o, en caso de embarazo, el nivel de la hCG en un primer intervalo inferior o igual a un primer umbral; el segundo ensayo proporciona una indicación del nivel de la hCG en un segundo intervalo superior o igual a un segundo umbral y en el que los ensayos primero y segundo proporcionan conjuntamente una indicación del nivel de la hCG en un tercer intervalo superior al primer umbral, pero inferior al segundo umbral.

Los ensayos primero y/o segundo pueden comprender además una zona de control para indicar que la prueba de ensayo se ha llevado a cabo satisfactoriamente, es decir, que los reactivos estaban presentes en el dispositivo de prueba y que se han movilizad o durante la realización de la prueba y se han transportado a lo largo de la vía de flujo. La zona de control puede indicar también que los reactivos en el interior del dispositivo son capaces de participar en interacciones inmunoquímicas, lo que confirma la integridad química del dispositivo. Esto es importante cuando se considera el almacenamiento y el envío del dispositivo en condiciones de desecación en un cierto intervalo de temperaturas. La zona de control está típicamente situada detrás de la zona de detección y, por ejemplo, puede comprender un reactivo de unión inmovilizado para un reactivo de unión marcado. El reactivo de unión marcado puede estar presente en forma movilizad o delante de la zona de control y de la zona de detección. El reactivo de unión marcado puede ser el mismo o distinto del reactivo de unión marcado para el analito.

El dispositivo de ensayo puede comprender un receptor de muestras poroso en conexión líquida con las vías primera y segunda de flujo y anterior a las mismas. El receptor de muestras poroso puede ser común a los dos ensayos. Por lo tanto, una muestra líquida aplicada en la región común de aplicación de muestras del dispositivo es capaz de desplazarse a lo largo de las vías de flujo de los ensayos respectivos a las zonas de detección respectivas.

El receptor de muestras poroso puede localizarse dentro del alojamiento o puede extenderse al menos parcialmente hacia fuera de dicho alojamiento y puede servir, por ejemplo, para recoger una muestra de un chorro de orina. El receptor de muestras poroso puede actuar como depósito de líquido. El elemento receptor de muestras poroso puede estar hecho de cualquier material absorbente, poroso o fibroso capaz de absorber un líquido rápidamente. La porosidad del material puede ser unidireccional (es decir, con poros o fibras que se extienden total o predominantemente paralelos a un eje del elemento) o multidireccional (omnidireccional, de modo que el elemento tiene una estructura amorfa similar a una esponja). Pueden usarse materiales plásticos porosos como polipropileno, polietileno (preferentemente de muy alto peso molecular), fluoruro de polivinilideno, vinilacetato de etileno, acrilonitrilo y politetrafluoroetileno. Otros materiales adecuados incluyen fibra de vidrio.

Si se desea, puede proporcionarse un "sumidero" absorbente en el extremo distal del material de soporte. El sumidero absorbente puede componerse, por ejemplo, de papel de cromatografía Whatmann 3MM y deberá proporcionar suficiente capacidad de absorción para permitir la unión de todo el reactivo de unión marcado sin unir para eliminarlo de la zona de detección. Como alternativa a un sumidero semejante, puede ser suficiente disponer de una longitud de material poroso en fase sólida que se extiende más allá de la zona de detección.

Después de la aplicación de un reactivo de unión a una zona de detección, el resto del material poroso en fase sólida puede tratarse para bloquear todos los sitios de unión restantes. El bloqueo puede conseguirse, por ejemplo, por tratamiento con una proteína (por ejemplo, albúmina de suero bovino o proteína láctea) o con alcohol polivinílico o combinaciones de los mismos. Para facilitar la libre movilidad del reactivo de unión marcado cuando el soporte poroso se humidifica con la muestra, dicho soporte poroso puede comprender además un azúcar como sacarosa o lactosa y/u otras sustancias como alcohol polivinílico (PVA) o polivinilpirrolidona (PVP). Este material puede depositarse, por ejemplo, como una disolución acuosa en la región en la que ha de aplicarse el reactivo de unión marcado. Tales materiales podrían aplicarse en el soporte poroso como una primera aplicación, seguida de la aplicación del marcador, alternativamente, tales materiales podrían mezclarse con el marcador y aplicarse en el soporte poroso o combinaciones de ambos. Tal material puede depositarse delante del reactivo de unión marcado o en este.

Alternativamente, puede no bloquearse el soporte poroso en el momento de la fabricación; en lugar de ello, las sustancias para bloquear el soporte poroso se incluyen en un material anterior al soporte poroso. Al humedecer la tira de prueba, las sustancias para bloquear el soporte poroso se movilizan y las sustancias de bloqueo fluyen en el soporte poroso y a través del mismo y lo bloquean a medida que avanza el flujo. Las sustancias de bloqueo incluyen proteínas como BSA y caseína, así como polímeros como PVP, PVA, así como azúcares y detergentes como Triton X100. Las sustancias de bloqueo podrían estar presentes en un material de soporte macroporoso.

El soporte poroso de nitrocelulosa puede tener un tamaño de poro de al menos aproximadamente 1 μm , por ejemplo, mayor que aproximadamente 5 μm y, por ejemplo, de aproximadamente 8 a 12 μm .

El soporte poroso de nitrocelulosa puede estar reforzado en la parte posterior, por ejemplo, con una lámina de plástico, para aumentar su resistencia al manejo. Este refuerzo puede fabricarse fácilmente formando una capa fina de nitrocelulosa sobre una lámina del material de refuerzo como Mylar®.

Los reactivos de unión secos pueden proporcionarse en un material de soporte poroso anterior a un material de soporte poroso que comprende la zona de detección. El material de soporte poroso anterior puede ser macroporoso. El material de soporte macroporoso deberá presentar baja o ninguna unión a proteínas o deberá ser fácilmente bloqueable por medio de reactivos como BSA o PVA para minimizar la unión inespecífica y facilitar el movimiento libre del reactivo marcado después de que el cuerpo macroporoso se haya humedecido con la muestra líquida. El material de soporte macroporoso puede pretratarse con un agente tensioactivo o un disolvente, si es necesario, para hacerlo más hidrófilo y para estimular una rápida absorción de la muestra líquida. Los materiales adecuados para un soporte macroporoso incluyen materiales plásticos como polietileno y polipropileno u otros materiales como papel o fibra de vidrio. En caso de que el reactivo de unión marcado esté marcado con una partícula detectable, el cuerpo macroporoso puede tener un tamaño de poro al menos diez veces mayor que el máximo tamaño de partícula del marcador particulado. Tamaños de poro mayores permiten una mejor liberación del reactivo marcado. Como alternativa a un soporte macroporoso, el reactivo de unión marcado puede proporcionarse en un sustrato no poroso anterior a la zona de detección, en el que dicho sustrato no poroso forma parte de la vía de flujo.

Los ensayos primero y/o segundo pueden comprender un soporte macroporoso de fibra de vidrio anterior y superpuesto en su extremo distal a un soporte poroso de nitrocelulosa.

El dispositivo de ensayo comprende sistemas de iluminación y detección para la iluminación y la detección de un reactivo óptico de unión marcado en las zonas de detección, como un fotodetector y una o más fuentes luminosas, como un LED colocado de modo que ilumine ópticamente las zonas de detección para determinar el nivel y/o la cantidad de las especies marcadas presentes. El dispositivo de ensayo puede comprender además uno o más de entre una fuente de energía, un sistema de transducción de señales, un algoritmo, un sistema de memoria y un puerto de entrada y salida de datos. El dispositivo de ensayo puede comprender un alojamiento que sirve para alojar los ensayos primero y segundo así como otros componentes del dispositivo. El dispositivo comprende valores umbral almacenados.

El dispositivo de ensayo comprende típicamente un alojamiento que contiene los ensayos. El alojamiento puede ser impermeable a los líquidos y estar construido de un material plástico adecuado, como ABS. El ensayo puede comprender además un elemento receptor de muestras para la recepción de la muestra líquida. El elemento receptor de muestras puede extenderse desde el alojamiento.

El alojamiento puede estar construido de un material impermeable a los líquidos. Es de desear también que el alojamiento excluya la luz ambiental. Se considerará que el alojamiento o cubierta excluye sustancialmente la luz ambiental si menos del 10%, preferentemente menos del 5% y, con la máxima preferencia, menos del 1% de la luz visible incidente en el exterior del dispositivo penetra en el interior de dicho dispositivo. Una elección adecuada para uso en la fabricación del alojamiento es un material plástico sintético impermeable a la luz como policarbonato, ABS, poliestireno, poliestirol, polietileno de alta densidad o polipropileno con un pigmento fotobloqueante apropiado. En el exterior del alojamiento puede incluirse una abertura que comunique con el ensayo localizado en el espacio interior dentro del alojamiento. Alternativamente, la abertura puede servir para permitir la extensión de un receptor de muestras poroso desde el alojamiento hasta una posición externa al alojamiento.

Los ensayos primero y segundo pueden proporcionarse, por ejemplo, en una disposición yuxtapuesta o en una disposición enfrentada, en el que un ensayo se dispone por encima del otro. El dispositivo puede comprender un único fotodetector para detectar las dos zonas de detección.

Además de la medida de las zonas de detección de los ensayos respectivos, así como de las zonas de control si están presentes, el sistema óptico puede medir también una zona de referencia, es decir, una porción de la vía de flujo que no contiene ningún reactivo de unión en estado seco.

La finalidad de la zona de referencia es proporcionar un valor de la señal con el que comparar el valor de la señal obtenido en la zona de detección. La medida de la zona de referencia permite la medida de los niveles de fondo de la luz reflejada o transmitida por la vía de flujo. El nivel de fondo puede ser debido, por ejemplo, a la reflectancia óptica del soporte poroso, a la presencia de la muestra líquida o de componentes del ensayo como un reactivo de unión marcado. Por lo tanto, los niveles de luz medidos en la zona de detección pueden corregirse con respecto a los niveles de luz de fondo para proporcionar una señal compensada indicativa de la cantidad de reactivo de unión marcado presente en la zona de detección. La medida en la zona de referencia puede compensar también las variaciones entre las muestras líquidas aplicadas en los dispositivos de ensayo, por ejemplo, las muestras de orina pueden variar ampliamente en color.

Un dispositivo de ensayo para la medida del nivel del analito en una muestra líquida puede comprender un sistema de detección óptica dispuesto para medir la intensidad de la luz reflejada por una zona de detección, una zona de control y una zona de referencia de un dispositivo de ensayo. El sistema óptico puede comprender una o más fuentes luminosas, como un LED y uno o más fotodetectores.

Típicamente, el ensayo se llevará a cabo en un tiempo durante el que el reactivo de unión marcado se acumula en las zonas de prueba y de control. Un tiempo típico para la prueba de ensayo para la determinación de la hCG en

orina son tres minutos. El tiempo de la prueba de ensayo puede iniciarse automáticamente, por ejemplo, cuando el sistema óptico determina que la muestra líquida ha alcanzado una porción de la vía de flujo o el soporte poroso.

Una fuente luminosa adecuada es un LED. El color del LED se determinará en función del color del reactivo de unión marcado. Para un marcador azul, un color adecuado para el LED es rojo. El LED puede iluminarse con una frecuencia o frecuencias concretas con el fin de iluminar una zona concreta del dispositivo de ensayo. La luz es reflejada o transmitida por la zona a un fotodetector que registra una señal eléctrica. El número de señales eléctricas registradas dependerá de la frecuencia de operación del LED y, por lo tanto, pueden registrarse una o más señales con el tiempo. Típicamente, las señales se expresarán como % de absorbancia (%A). La señal puede determinarse después de completarse el tiempo del ensayo o puede determinarse antes, por ejemplo después de haber superado un umbral de señal concreto.

Cada zona de medida se ilumina típicamente con un único LED. Un fotodetector puede detectar luz de más de una zona de medida y, por lo tanto, luz reflejada de más de un LED. Esto puede conseguirse al llevar a cabo el proceso de iluminación secuencialmente, de modo que el dispositivo es capaz de saber qué zona está reflejando la luz al fotodetector. El proceso de iluminación secuencial puede repetirse con una frecuencia fija o variable durante la duración del ensayo, de modo que pueden monitorizarse los niveles de la señal con el tiempo en cada zona. Las tiras de ensayo pueden colocarse en una disposición yuxtapuesta y el fotodetector y las fuentes luminosas colocarse por encima del plano de las tiras, de modo que las zonas de detección, control y referencia se coloquen dirigidas hacia las fuentes luminosas y los detectores ópticos.

El dispositivo puede comprender un sistema para detectar la adición de la muestra al dispositivo de ensayo. Por ejemplo, puede monitorizarse el cambio de los niveles de luz detectados en una o más zonas para determinar si y cuando se ha aplicado una muestra líquida en el dispositivo. El momento de inicio de la prueba de ensayo puede determinarse automáticamente, por ejemplo, cuando la muestra líquida ha alcanzado una zona concreta.

El dispositivo puede comprender un sistema de control de flujo, en el que el cambio de los niveles de luz detectados en una o más zonas puede usarse para determinar si y cuando se ha aplicado una muestra líquida en el dispositivo y para determinar la tasa de flujo de la muestra líquida a lo largo del dispositivo por medida del flujo entre una o más zonas medidas. La determinación de la tasa de flujo puede usarse como un control de calidad más, por ejemplo, el ensayo puede rechazarse si la tasa de flujo es superior o inferior a valores establecidos. El circuito de computación puede responder a las señales para calcular una tasa de flujo para un líquido que fluye a lo largo del soporte, comparar la tasa de flujo calculada con los límites superior e inferior y rechazar el resultado del ensayo si la tasa de flujo calculada se encuentra fuera de los límites superior e inferior.

El sistema típico de detección óptica comprenderá al menos una fuente luminosa y al menos un fotodetector (como un fotodiodo). Las fuentes luminosas preferidas son diodos emisores de luz o LED. El fotodetector puede medir la luz reflejada y/o la luz transmitida. Para los fines de esta descripción, por luz reflejada se entiende que la luz de la fuente luminosa es reflejada al fotodetector por el soporte poroso u otro soporte de transporte de líquido. En esta situación, el detector se localiza típicamente en el mismo lado del soporte que la fuente luminosa. La luz transmitida se refiere a luz que pasa a través del soporte y, típicamente, el detector se localiza en el lado del soporte opuesto a la fuente luminosa. Para la finalidad de una medida de reflectancia, el soporte puede incluir un refuerzo posterior, como una capa reflectora blanca de plástico Mylar®. De este modo, la luz de la fuente luminosa incidirá sobre el soporte, parte de la misma será reflejada por su superficie y parte penetrará en el soporte y será reflejada a cualquier profundidad hasta, inclusive, la profundidad a la que se localiza la capa reflectora. Por lo tanto, un tipo de medida de la reflectancia puede implicar de hecho la transmisión de luz a través de al menos parte del espesor del soporte poroso.

El dispositivo de ensayo comprenderá típicamente una o más aberturas o ventanas a través de las cuales puede brillar la luz de una o más fuentes de iluminación sobre una zona concreta del ensayo o de la tira de ensayo. Las ventanas sirven para definir el área de luz que incide sobre una zona concreta y para definir qué parte del ensayo o de la tira de ensayo se ilumina. Cada zona que haya de iluminarse puede tener una ventana correspondiente. Por lo tanto, un dispositivo con cuatro zonas de medida tendrá cuatro ventanas. La luz reflejada de las ventanas es recogida por uno o más fotodetectores. Para un dispositivo de ensayo que comprende una vía de flujo con varias zonas, puede medirse el tiempo que necesita la muestra líquida para desplazarse entre las zonas.

Las medidas de la luz reflejada de cada ventana pueden tomarse periódicamente (por ejemplo, aproximadamente dos veces por segundo) y puede usarse un filtro digital de paso bajo para rechazar el ruido y suavizar los datos. Los valores filtrados pueden usarse para detectar el flujo y determinar el resultado del ensayo.

Para cada ventana puede calcularse un cociente entre el valor medido cuando la zona de medida concreta en la vía de flujo está seca ("valor de calibración"), es decir, antes de que ninguna muestra líquida haya alcanzado dicha zona, y el valor medido cuando la zona de medida está húmeda y puede haberse desarrollado una línea. Este cociente es igual a la proporción de luz reflejada después del cambio de las propiedades de reflexión de la vía de flujo como consecuencia del paso de la muestra líquida a lo largo de la vía de flujo. Por ejemplo, cuando la vía de flujo comprende un soporte poroso como nitrocelulosa, el cambio de las propiedades de reflexión puede ser bastante

acusado.

5 Para cada ventana, el cociente de ventana en las ventanas de referencia, de control y de prueba es igual al valor medido cuando el soporte poroso está seco, $t = 0$ (antes de la adición de la muestra), dividido por el valor medido en el tiempo t después de la adición de la muestra:

Para cada punto temporal, t , los cocientes de ventana para cada ventana pueden evaluarse como sigue:

$$\text{Cociente de referencia}_t = \frac{\text{valor de la ventana de referencia filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de referencia filtrado}_{\text{tiempo}=t}}$$

10

$$\text{Cociente de prueba}_t = \frac{\text{valor de la ventana de prueba filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de prueba filtrado}_{\text{tiempo}=t}}$$

$$\text{Cociente de control}_t = \frac{\text{valor de la ventana de control filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de control filtrado}_{\text{tiempo}=t}}$$

15 CÁLCULO DE LOS VALORES DEL %A FILTRADOS

Para cada punto temporal, t , los valores del %A pueden calcularse usando estos cocientes para una línea de prueba y una línea de control y con el cociente de referencia como valor de referencia para el fondo que podría haberse producido en todas las ventanas si no se hubiera desarrollado una línea.

20

$$\text{Prueba}_t (\%A) = \frac{\text{cociente de referencia}_t - \text{cociente de prueba}_t}{\text{cociente de referencia}_t} \times 100\%$$

$$\text{Control}_t (\%A) = \frac{\text{cociente de referencia}_t - \text{cociente de control}_t}{\text{cociente de referencia}_t} \times 100\%$$

25 El dispositivo de ensayo puede comprender un umbral de control almacenado (CLT), en el que si el valor de la señal determinado para el control es inferior a CLT, el resultado se rechazará debido a un desarrollo insuficiente de la línea de control y si dicho valor es superior a CLT, se considerará que el control es satisfactorio.

30 De acuerdo con una realización, el dispositivo de ensayo puede comprender dos tiras de prueba de ensayo, cada una de las cuales comprende un soporte poroso, en el que un ensayo es un ensayo de alta sensibilidad (HS), es decir, el ensayo es sensible a niveles del analito a bajas concentraciones del mismo y el otro es un ensayo de baja sensibilidad (LS), es decir, el ensayo es sensible al analito a altas concentraciones del mismo.

35 El dispositivo de ensayo puede comprender dos zonas de prueba (detección), en el que cada tira de prueba de ensayo comprende una zona de prueba, una zona de referencia y una zona de control. Las señales pueden medirse en las dos zonas, HS y LS y pueden definirse como sigue:

$$\text{Cociente HS}_t = \frac{\text{valor de la ventana de prueba HS filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de prueba HS filtrado}_{\text{tiempo}=t}}$$

$$40 \quad \text{Cociente LS}_t = \frac{\text{valor de la ventana de prueba LS filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de prueba LS filtrado}_{\text{tiempo}=t}}$$

Los valores del %A filtrados para las zonas HS y LS pueden definirse como sigue:

$$\text{HS}_t (\%A) = \frac{\text{cociente de referencia}_t - \text{cociente de prueba HS}_t}{\text{cociente de referencia}_t} \times 100\%$$

45

$$LS_t (\%A) = \frac{\text{cociente de referencia}_t - \text{cociente de prueba } LS_t}{\text{cociente de referencia}_t} \times 100\%$$

El porcentaje de atenuación relativa normalizado (%A) viene dado por la diferencia entre el cociente de la ventana de referencia y el cociente de la ventana que se considera (ventana de control o de prueba) dividido por el cociente de la ventana de referencia y multiplicado por el 100%.

Típicamente, los valores del %A serán aquellos obtenidos en el tiempo completo de desarrollo del ensayo (FDT).

DETECCIÓN Y VALIDACIÓN DEL FLUJO

Detección del flujo

El cociente de ventana para cada ventana puede usarse para detectar el flujo de líquido que pasa por la ventana. Se considera que el flujo ha alcanzado una ventana cuando el cociente ha disminuido en el porcentaje del umbral de detección del flujo (fdt%). Este corresponde a un aumento del valor filtrado sobre su valor de calibración en la misma proporción.

Para el tiempo t,

$$\text{Cociente de ventana} \geq \frac{1}{1 + \text{fdt}\%}$$

$$\frac{\text{valor filtrado}_{\text{tiempo}=t}}{\text{valor filtrado}_{\text{tiempo}=0}} \geq 1 + \text{fdt}\%$$

o

El tiempo para cada ventana cuando el criterio se satisface por primera vez se registra para la validación del flujo.

Validación del flujo

Es posible almacenar diversos parámetros correspondientes al flujo en el dispositivo y usarlos para clasificar el flujo de una muestra líquida a lo largo del soporte poroso de un dispositivo de ensayo. El dispositivo puede mostrar cualquier error en el flujo a consecuencia del uso del dispositivo.

El dispositivo puede comprender almacenados uno o más de entre un tiempo de detección de flujo mínimo (Min FDT), un tiempo de detección de flujo máximo (Max FDT), un tiempo de tránsito de ventana mínimo (Min MTT) y un umbral de detección de flujo (fdt).

El dispositivo puede comprender una serie de valores umbral almacenados, como el umbral de línea de control. Los valores por encima o en este umbral pueden considerarse como un control válido y los valores por debajo de este umbral pueden considerarse como un control inválido, es decir, la prueba se rechazará.

El dispositivo de ensayo puede comprender además uno o más parámetros de medida de sobreflujo almacenados, en el que si cualquiera de las medidas es superior o muy inferior al valor que se habría esperado, el resultado se rechazará. Esto permite al dispositivo de ensayo rechazar, por ejemplo, fallos de hardware como interrupciones o cortocircuitos en la placa de circuitos, una batería descargada, una ventana óptica bloqueada, un LED apagado etcétera.

El dispositivo de ensayo puede comprender un umbral adicional, por ejemplo, un umbral de decisión temprana (EDT), en el que si la señal supera dicho umbral en cualquier momento durante la prueba, se obtiene un resultado temprano, es decir, antes de cumplirse el tiempo nominal de realización de la prueba (el tiempo total de desarrollo de la señal). En el caso de una medida de la hCG, se obtendrá una indicación de embarazo en el sistema de visualización. El dispositivo de ensayo puede comprender además un valor almacenado correspondiente a un tiempo de desarrollo mínimo (MDT), en el que el dispositivo de ensayo solo proporcionará un resultado temprano una vez que se ha superado el MDT.

Los diversos valores umbral almacenados pueden almacenarse en el dispositivo como parte de uno o más algoritmos.

De acuerdo con una realización, se proporciona un dispositivo de ensayo para la detección del analito hCG en orina,

en el que el dispositivo comprende:

5 un sistema óptico de iluminación y detección para la iluminación y detección de un reactivo de unión marcado en las zonas de detección, un sistema de computación para el cálculo del nivel de la hCG o un valor correspondiente al nivel de la hCG, un sistema de visualización para visualizar el resultado de la prueba de ensayo, un valor umbral de base almacenado, en el que un nivel de la hCG correspondiente a un valor por debajo del valor umbral de base almacenado indica la ausencia de embarazo y en el que un nivel de la hCG correspondiente a un valor en el umbral de base almacenado o por encima de este indica embarazo, otros dos valores umbral almacenados primero y segundo, en el que un nivel de la hCG correspondiente a un valor por encima del umbral de base pero inferior o igual a un primer valor umbral indica un nivel de embarazo en un primer intervalo, un nivel de la hCG correspondiente a un valor por encima del umbral de base y superior al segundo umbral indica un nivel de embarazo en un tercer intervalo y un nivel de la hCG correspondiente a un valor por encima del umbral de base y superior o igual al primer umbral pero inferior al segundo umbral indica un nivel de la hCG en un tercer intervalo, en el que el sistema de visualización es capaz de indicar un estado sin embarazo o un estado de embarazo y la edad gestacional.

El primer ensayo difiere del segundo ensayo en que los ensayos respectivos son capaces de medir el analito a niveles diferentes.

20 Por ejemplo, los ensayos primero y segundo pueden emplear diferentes arquitecturas de ensayo, de modo que el primer ensayo emplea una reacción de unión de sándwich y el segundo ensayo emplea una reacción de competición o de inhibición. El primer ensayo puede comprender un reactivo de unión marcado movilizable para el analito, anterior a una zona de detección, en el que dicha zona de detección comprende un reactivo de unión inmovilizado sin marcar para el analito y el segundo ensayo puede comprender un reactivo de unión movilizable para el analito, anterior a un reactivo de unión sin marcar inmovilizado para el reactivo de unión movilizable. Alternativamente, el segundo ensayo puede comprender un analito marcado movilizable o un reactivo análogo del analito, anterior a un reactivo de unión inmovilizado sin marcar para el analito o el análogo del analito. Por ejemplo, el ensayo de sándwich puede ser el ensayo de alta sensibilidad, es decir, es capaz de medir el analito en un intervalo de concentraciones menores y el ensayo de inhibición o de competición puede ser un ensayo de baja sensibilidad, es decir, es capaz de medir el analito en un intervalo de concentraciones mayores.

35 Por ejemplo, el dispositivo de ensayo puede comprender un primero y un segundo ensayo, en el que el reactivo de unión sin marcar del primer ensayo difiere del reactivo de unión sin marcar del segundo ensayo y/o el reactivo de unión marcado del primer ensayo difiere del reactivo de unión marcado del segundo ensayo. Por ejemplo, esta puede ser una diferencia de concentración o una diferencia de afinidad por un analito, un análogo del analito o un reactivo de unión. Un reactivo de unión de alta afinidad tendrá una mayor sensibilidad al analito que un reactivo de unión de menor afinidad. De manera similar, una baja concentración del reactivo de unión tendrá menor sensibilidad al analito que una alta concentración del reactivo de unión. Los ensayos primero y segundo pueden variarse de esta manera, de modo que sean capaces de determinar un analito en diferentes intervalos de concentraciones.

40 Por lo tanto, el dispositivo de ensayo puede comprender un primer ensayo de alta sensibilidad al analito que comprende un reactivo de unión marcado movilizable de una cierta concentración o afinidad, anterior a una zona de detección, y un segundo ensayo de baja sensibilidad al analito que comprende un reactivo de unión marcado movilizable con una menor concentración o afinidad, anterior a una zona de detección. Alternativa o adicionalmente, el primer ensayo comprende un reactivo de unión inmovilizado en una zona de detección de una cierta concentración o afinidad y un segundo ensayo puede comprender un reactivo de unión inmovilizado en una zona de detección con una menor concentración o afinidad.

50 La sensibilidad del ensayo puede manipularse mediante alteración de la relación entre el reactivo de unión y el marcador. Si se usa una partícula como marcador, puede alterarse la cantidad del reactivo de unión que se añade al marcador. Otra manera más de manipular la sensibilidad de un ensayo es variar la cantidad del marcador usado en el ensayo. Por ejemplo, la sensibilidad de un ensayo puede disminuirse reduciendo la relación entre el reactivo de unión y la especie marcada para el reactivo de unión marcado. Por lo tanto, el dispositivo de ensayo puede comprender un primer ensayo de alta sensibilidad al analito y un segundo ensayo de baja sensibilidad al analito, en el que el primer ensayo comprende un reactivo de unión marcado con una partícula y movilizable, anterior a una zona de detección, con una relación entre el reactivo de unión y el marcador particulado y en el que el segundo ensayo comprende un reactivo de unión marcado con una partícula y movilizable, anterior a una zona de detección, con una relación entre el reactivo de unión y el marcador particulado inferior a la del primer ensayo.

60 Otra manera de manipular la sensibilidad de un ensayo es alterar la densidad óptica del marcador. La sensibilidad del ensayo puede reducirse con el uso de un marcador con una baja densidad óptica. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante un marcador de partículas de polímero con una baja concentración de colorante o mediante el uso de un marcador coloreado que es menos sensible a un detector óptico. Por lo tanto, el dispositivo de ensayo puede comprender un primer ensayo de alta sensibilidad al analito y un segundo ensayo de baja sensibilidad al analito, en el que el primer ensayo comprende un reactivo de unión marcado con una partícula y movilizable, anterior a una zona de detección, en el que dicho marcador tiene una densidad óptica y en el que el segundo ensayo

comprende un reactivo de unión marcado con una partícula y movilizable, anterior a una zona de detección, en el que el marcador tiene una densidad óptica inferior a la del primer ensayo.

5 Otra manera más de medir altos niveles de analito es emplear un reactivo de unión marcado con un marcador no
 10 particulado. Unos niveles altos del analito cuando se miden por medio de un ensayo de unión de sándwich requieren
 altos niveles del reactivo de unión. En el caso en el que el marcador es un marcador particulado, la presencia de
 altos niveles de analito dentro del soporte poroso o sobre este puede dar lugar a un impedimento estérico que
 resulta en una escasa sensibilidad del ensayo. A la inversa, para niveles de analito inferiores, el uso de un reactivo
 15 de unión marcado con un marcador no particulado puede dar lugar a una baja señal debido a la baja densidad
 óptica. Sin embargo, para altos niveles de analito, los marcadores no particulados pueden detectarse fácilmente. Por
 consiguiente, el ensayo puede comprender un primer ensayo de alta sensibilidad al analito que comprende un
 reactivo de unión marcado con una partícula ópticamente detectable, anterior a una zona de detección y un segundo
 ensayo de baja sensibilidad al analito que comprende un reactivo de unión marcado con un marcador no particulado
 ópticamente detectable, anterior a una zona de detección. Un ejemplo de un marcador no particulado ópticamente
 detectable puede ser un colorante. El colorante puede ser fluorescente.

La sensibilidad del ensayo puede ser afectada por la tasa de flujo del soporte poroso. Una manera de reducir la
 sensibilidad del ensayo es emplear un soporte poroso (como nitrocelulosa) con una elevada tasa de flujo. Por lo
 tanto, el dispositivo de ensayo puede comprender un primer ensayo de alta sensibilidad al analito con un soporte
 20 poroso con una tasa de flujo y un segundo ensayo de baja sensibilidad al analito con un soporte poroso con una tasa
 de flujo superior o más rápida que la del primer ensayo.

La sensibilidad de un ensayo puede manipularse alternativa o adicionalmente modificando la velocidad a la que el
 reactivo de unión marcado se libera de su origen. Otra manera más de reducir la sensibilidad al analito es
 25 proporcionar una rápida liberación del reactivo de unión marcado del soporte poroso durante el contacto con la
 muestra líquida. La liberación del reactivo de unión marcado puede modificarse por la presencia de azúcares,
 proteínas u otras sustancias poliméricas como metilcelulosa dentro del dispositivo. Tales sustancias pueden incluirse
 en la proximidad de los reactivos de unión o anteriores a estos.

30 USO DE UN REACTIVO DEPURADOR

La presente invención reduce la sensibilidad al analito al proporcionar un reactivo de unión depurador para unirse al
 analito. El reactivo de unión depurador se proporciona anterior a una zona de detección y es movilizable. El reactivo
 35 de unión depurador puede proporcionarse en la misma región del soporte poroso que el reactivo de unión
 movilizable, anterior a este o posterior a este. El reactivo de unión depurador puede unirse a la misma región de
 unión del analito que el reactivo de unión marcado movilizable o a una diferente región del analito que el reactivo de
 unión marcado. El segundo ensayo o los dos ensayos pueden emplear un reactivo de unión depurador y los
 reactivos de unión depuradores pueden diferir entre sí en cuanto a su concentración, afinidad o ambas.

40 Para los fines de esta solicitud, el término reactivo de unión depurador denota un reactivo de unión adicional capaz
 de unirse al analito y el término "depurador" se usa solamente para distinguir los reactivos de unión de los otros
 reactivos de unión presentes en el dispositivo. Típicamente, el reactivo de unión depurador no está marcado.

De acuerdo con una realización, el dispositivo de ensayo comprende un primer ensayo que comprende un primer
 45 soporte poroso que comprende un reactivo de unión marcado movilizable anterior a una zona de detección y un
 segundo ensayo que comprende un reactivo de unión marcado movilizable anterior a una zona de detección y un
 reactivo de unión depurador también anterior a la zona de detección del segundo ensayo. El primer ensayo puede
 ser el ensayo de alta sensibilidad al analito y el segundo ensayo puede ser el ensayo de baja sensibilidad al analito.

50 El reactivo depurador puede tener una afinidad diferente por el analito que el reactivo de unión marcado movilizable
 del segundo ensayo. En una realización ejemplar, el reactivo de unión depurador tiene mayor afinidad por el analito
 que el reactivo de unión movilizable del segundo ensayo. La cantidad de reactivo de unión depurador puede variarse
 para cambiar la sensibilidad del segundo ensayo para adecuarse a la concentración del analito. El aumento de la
 cantidad de reactivo de unión depurador presente reduce la sensibilidad del ensayo debido a que el reactivo de
 55 unión depurador es capaz de unirse a más analito, lo que reduce eficazmente la proporción del reactivo de unión
 marcado que es capaz de unirse a la zona de detección. La cantidad del reactivo de unión marcado en los ensayos
 primero y segundo puede variar. El aumento de la cantidad de reactivo de unión marcado tiende a reducir el efecto
 de gancho y la cantidad de reactivo de unión marcado presente, especialmente en el ensayo de baja sensibilidad,
 puede variarse dependiendo del intervalo de concentraciones del analito.

60 El reactivo de unión depurador puede ser capaz de unirse a la misma o a una región diferente del analito. En una
 realización ejemplar, el reactivo de unión depurador es capaz de unirse a una región diferente del analito. En
 particular, el reactivo de unión depurador puede ser capaz de unirse a la subunidad β de la hCG y el reactivo de
 unión marcado movilizable es capaz de unirse a la subunidad α de la hCG.

65 De acuerdo con una realización ejemplar, el dispositivo de ensayo comprende un primer ensayo que comprende un

material de soporte poroso de fibra de vidrio que comprende un reactivo de unión marcado con una partícula y movilizable para un analito y un material de soporte poroso de nitrocelulosa posterior al material de soporte poroso de fibra de vidrio que tiene una zona de detección que comprende un reactivo de unión inmovilizado para el analito y un segundo ensayo que comprende un material de soporte poroso de fibra de vidrio que comprende un reactivo de unión marcado con una partícula y movilizable para una primera región del analito y un reactivo de unión depurador movilizable para una segunda región del analito y un material de soporte poroso de nitrocelulosa posterior al material de soporte poroso de fibra de vidrio que tiene una zona de detección que comprende un reactivo de unión inmovilizado para la segunda región de unión del analito.

Se apreciará que las maneras anteriores de alterar la sensibilidad de un ensayo no son exhaustivas y además podrían usarse en combinación. El dispositivo de ensayo puede comprender uno o más de los elementos anteriores para condicionar la sensibilidad del ensayo, además del uso de un reactivo depurador. La arquitectura concreta elegida para el ensayo dependerá del analito y su intervalo de concentraciones.

Para evitar dudas, por la presente se afirma expresamente que cualquier elemento descrito en este documento como "preferido", "deseable", "ventajoso" o similar puede estar presente en la invención aislado o en combinación con cualquier otro elemento así descrito, a menos que el contexto imponga lo contrario.

Los aspectos de la invención se ilustran más detalladamente por referencia a las figuras siguientes:

La figura 1 ilustra típicas señales de respuesta que se observan en un ensayo de sándwich típico en comparación con las de un ensayo de competición típico.

La figura 2 ilustra representaciones gráficas de la intensidad de la señal frente a la concentración de la hCG para el ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1.

La figura 3 ilustra una representación gráfica de la intensidad de la señal frente a la concentración de la hCG para el dispositivo de ensayo de acuerdo con el ejemplo 2.

La figura 4 ilustra el efecto de la variación de las cantidades de anticuerpo depurador para el dispositivo de ensayo de acuerdo con el ejemplo 2.

Ejemplo comparativo 1. Preparación de un dispositivo de ensayo que comprende un único soporte poroso que comprende una primera zona de detección anterior para un ensayo de sándwich y una segunda zona de detección posterior para un ensayo de inhibición.

Una tira de prueba de ensayo que comprendía una primera zona de detección anterior para un ensayo de sándwich y una segunda zona de detección posterior para un ensayo de inhibición, así como un reactivo de unión marcado movilizable anterior a dichas zonas, se preparó de la manera siguiente:

Preparación de la zona de detección posterior

Una disolución de 1,5 mg/ml de un anticuerpo de ratón dirigido contra β -hCG (clon propio 3468) en tampón PBSA y 7,2 kUI/ml de hCG (Scipac) en PBSA/ovoalbúmina se mezcló durante una hora para proporcionar un conjugado del anticuerpo dirigido contra β -hCG y hCG. El conjugado resultante se depositó como una línea en bandas de nitrocelulosa de 350 mm de largo por 40 mm de ancho (Whatman, con un tamaño de poro de 8 μ m y un espesor de entre 90 y 100 μ m, laminadas sobre una capa de refuerzo de 175 μ m). El conjugado producido anteriormente se aplicó como una línea de ~1,2 mm de ancho y ~300 mm de largo a una velocidad de 1 μ l/cm y a 16 mm del extremo de la banda de nitrocelulosa mediante una plataforma de aplicación Biodot xyz3050. Esto formó la segunda zona de detección posterior para un ensayo de inhibición.

Preparación de la zona de detección anterior

La primera zona de detección para un ensayo de sándwich (zona de detección anterior) se preparó por aplicación de una línea del anticuerpo dirigido contra β -hCG (clon propio 3468) en una concentración de 3 mg/ml en tampón PBSA, a una velocidad de 1 μ l/cm sobre la misma banda de nitrocelulosa en la que se había aplicado el conjugado del anticuerpo dirigido contra β -hCG y hCG. El anticuerpo dirigido contra β -hCG se aplicó mediante la plataforma de aplicación Biodot xyz3050 como una línea de ~1,2 mm de ancho y ~300 mm de largo a 10 mm del mismo extremo de la banda de nitrocelulosa en la que se había aplicado el conjugado del anticuerpo dirigido contra β -hCG y hCG.

Las bandas de NC se secaron mediante un horno de secado Hedinair, número de serie 17494, ajustado a 55 °C y a la velocidad 5 (paso único).

Después, la NC se bloqueó con un tampón de bloqueo que comprendía una mezcla de etanol al 5% (BDH AnalaR 104766P) más cloruro de sodio 150 mM (BDH AnalaR 10241AP) más Trizma base 50 mM (Sigma T1503) más XX

Tween 20 (Sigma P1379) y alcohol polivinílico (PVA, Sigma 360627) al 1% (p/v).

El tampón de bloqueo se aplicó a una velocidad de 1,75 $\mu\text{l}/\text{mm}$ en el extremo proximal de la banda. Una vez que la disolución había empapado la membrana, se aplicó una disolución de sacarosa (Sigma S8501 en agua desionizada) al 2% (p/v) con el mismo aparato, a una velocidad de 1,6 $\mu\text{l}/\text{mm}$, y se dejó que empapara la membrana durante aproximadamente cinco minutos.

Las bandas de NC se secaron después mediante un horno de secado Hedinair, número de serie 17494, ajustado a 75°C y a la velocidad 5 (paso único).

Preparación del reactivo de unión marcado

El reactivo de unión marcado se preparó de acuerdo con el protocolo siguiente:

Recubrimiento de partículas de látex con un anticuerpo dirigido contra α -hCG

1. Diluir partículas de látex azul de Duke Scientific (400 nm de diámetro, DB1040CB con el 10% de sólidos (p/v)) hasta el 2% de sólidos (p/v) con tampón de tetraborato de disodio 100 mM, pH 8,5 (BDH AnalaR 102676G) (DTB).

2. Lavar el látex diluido por centrifugación de 2 ml de látex diluido en dos tubos de centrifuga Eppendorf a 17.000 rpm (25.848 rcf) durante 10 minutos en una centrífuga Heraeus Biofuge 17RS. Retirar y desechar el sobrenadante y resuspender los sedimentos en DTB 100 mM para dar el 4% de sólidos (p/v) en un volumen total de 1 ml.

3. Preparar una mezcla de etanol y acetato de sodio (etanol BDH AnalaR 104766P al 95% con acetato de sodio Sigma S-2889 al 5% p/v).

4. Añadir 400 μl de la disolución de etanol y acetato de sodio al látex lavado en la etapa 2 (este es el 10% del volumen del látex).

5. Diluir el anticuerpo madre (clon propio 3299) para obtener un anticuerpo de $\sim 1.200 \mu\text{g}/\text{ml}$ en DTB.

6. Calentar 1 ml del anticuerpo diluido de la etapa 5 en un baño de agua ajustado a 41,5°C durante aproximadamente dos minutos. Calentar también el látex lavado más etanol y acetato de sodio de la etapa 4 en el mismo baño de agua durante dos minutos.

7. Añadir el anticuerpo diluido al látex más etanol y acetato, mezclar bien e incubar durante una hora en el baño de agua ajustado a 41,5°C mientras se mezcla con un agitador magnético y una barra magnética introducida en la mezcla.

8. Preparar una disolución de 40 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) (Intergen W22903 en agua desionizada). Bloquear el látex por adición de un volumen igual de BSA de 40 mg/ml a la mezcla de látex, anticuerpo y etanol-acetato e incubar en el baño de agua a 41,5°C durante 30 minutos en agitación continua.

9. Centrifugar la mezcla a 17.000 rpm durante 10 minutos como en la etapa 2 (dividir el volumen en lotes de 1 ml en tubos Eppendorf). Retirar y desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en DTB 100 mM. Repetir la centrifugación como en la etapa 2, retirar y desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en tampón Air Brushing (sacarosa Sigma S8501 al 20% (p/v), BSA al 10% (p/v) en Trizma base Sigma T1503 100 mM, pH 9). Añadir tampón Air Brushing para obtener látex con el 4% de sólidos (p/v).

El látex conjugado se pulverizó en una mezcla de BSA y sacarosa sobre un soporte poroso de fibra de vidrio (F529-09, Whatman) a una velocidad de 50 g/h y 110 mm/s y se secó con un horno de banda transportadora Hedinair, número de serie 17494, ajustado a 65°C y la velocidad 5 (paso único).

El material de fibra de vidrio con el látex pulverizado se fijó a la membrana de nitrocelulosa mediante una película laminada recubierta de un adhesivo claro (Ferrisgate, 38 mm de ancho), dispuesta de tal modo que el látex pulverizado quedó en la parte superior y la fibra de vidrio se solapó con la superficie de la nitrocelulosa en $\sim 2 \text{ mm}$ a lo largo de la longitud (350 mm) de la banda de la membrana de nitrocelulosa. La fibra de vidrio se fijó al extremo de la nitrocelulosa.

La banda laminada se cortó después en tiras de prueba de 6 mm de ancho.

Ejemplo 1

Se prepararon dispositivos de ensayo de manera similar al ejemplo comparativo 1, excepto por que las zonas primera y segunda de detección se proporcionaron en unas tiras primera y segunda de prueba, respectivamente, en

el que las zonas primera y segunda de detección se proporcionaron en nitrocelulosa y cada tira de prueba comprendía fibra de vidrio pulverizada con un anticuerpo dirigido contra α -hCG marcado con látex y movilizable, anterior a la nitrocelulosa. Las zonas primera y segunda de detección se proporcionaron, respectivamente, en las tiras de prueba de nitrocelulosa en la posición de 16 mm.

5

Funcionamiento de las tiras de prueba

Las tiras de prueba de acuerdo con el ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1 se probaron con lectores propios con patrones de tampón con hCG calibrados a concentraciones de 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 50.000, 150.000, 200.000 y 250.000 mUI/ml de hCG.

10

La intensidad de la señal medida en las zonas de detección de inhibición como función de la concentración de la hCG de los ensayos del ejemplo 1 (denotada por --♦--) y del ejemplo comparativo 1 (denotada por --■--) se muestra en la figura 2 como señal en unidades arbitrarias frente a mUI/ml de hCG.

15

Según puede observarse en esta figura, la zona de detección de inhibición del ejemplo comparativo 1 muestra una meseta inicial para niveles de la hCG en el intervalo de 0 a 100 mUI/ml, seguida de una disminución de la intensidad para mayores niveles de la hCG, según lo esperado. Sin embargo, a niveles aún mayores, se observó un aumento de la intensidad de la señal. En comparación, la intensidad de la señal del ejemplo 1 disminuye para niveles altos de la hCG sin el subsiguiente aumento de la intensidad de la señal para niveles mayores de la hCG. Según puede observarse, la zona de inhibición del dispositivo de ensayo construido de acuerdo con el ejemplo comparativo 1 permite un intervalo de medida de la hCG más limitado.

20

Ejemplo 2. Preparación de dispositivos de ensayo que comprenden una primera tira de prueba que comprende un primer ensayo de sándwich y una segunda tira de prueba que comprende un reactivo depurador además de un ensayo de sándwich.

25

Preparación de la tira de prueba del primer ensayo

La tira de prueba del primer ensayo se preparó de acuerdo con la tira de prueba del primer ensayo (sándwich) de acuerdo con el ejemplo 1.

30

Preparación de la tira de prueba del segundo ensayo (depurador)

La zona de detección se preparó en nitrocelulosa usando la preparación de acuerdo con la de la tira de prueba del primer ensayo del ejemplo 2.

35

Un anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón dirigido contra α -hCG humana (clon 3299) conjugado con 400 nm de látex de poliestireno azul (Duke Scientific) se mezcló con un anticuerpo depurador mAb de ratón dirigido contra β -hCG (clon propio 3468) en una concentración de 3 mg/ml para dar un % final de látex azul del 3%, una concentración final de 3468 de 0,075 mg/ml y una concentración del anticuerpo dirigido contra β -hCG libre de 0,06 mg/ml. La mezcla resultante se pulverizó con un aerógrafo sobre fibra de vidrio Whatman (F529, rollos de 25 mm de ancho) mediante el aparato Biodot xyzS (número de serie 1673) a 90 g/h, pulverizada a 2,02 μ g/cm sobre la fibra de vidrio F529-09.

40

La fibra de vidrio se secó mediante un horno de banda transportadora Hedinair, número de serie 17494, ajustado a 65°C y la velocidad 5 (paso único). Se depositó un segundo paso de látex sobre la fibra de vidrio repitiendo lo anterior, pero con un desplazamiento de ~0,8 mm con respecto a la posición original de la pulverización (en una localización posterior de la fibra de vidrio). La fibra de vidrio se secó según se describe anteriormente.

45

Ejemplo comparativo 2

50

Los dispositivos de ensayo construidos con las dos zonas de detección localizadas en el mismo soporte poroso no fueron capaces de resultar en una medida de la concentración de un analito en un amplio intervalo de concentraciones de dicho analito.

55

Los dispositivos de ensayo de acuerdo con el ejemplo 2 se probaron mediante lectores ópticos propios para la zona de detección con patrones de tampón con hCG calibrados para 12 concentraciones, desde 0 a 250.000 mUI/ml de hCG. Se midieron diez réplicas por nivel de concentración, lo que resultó en un número total de 120 dispositivos de ensayo probados.

60

La intensidad de la señal frente a la concentración de la hCG para el segundo ensayo construido de acuerdo con el ejemplo 2 se muestra en la figura 3.

La tira de prueba del primer ensayo de acuerdo con el ejemplo 2 fue capaz de determinar la cantidad de la hCG presente hasta aproximadamente 400 mUI/ml antes del aplanamiento de la curva de ensayo. La tira de prueba del

65

segundo ensayo de acuerdo con el ejemplo 2 fue capaz de detectar niveles de la hCG superiores a aproximadamente 1.000 mUI/ml. La medida conjunta de las señales en las tiras primera y segunda de prueba de ensayo permitió la determinación del nivel de la hCG entre aproximadamente 400 mUI/ml y 1.000 mUI/ml.

5 El efecto de la variación de las cantidades del anticuerpo depurador

Se prepararon tiras de prueba del segundo ensayo de acuerdo con el ejemplo 2, excepto porque la cantidad de anticuerpo depurador presente se varió durante la preparación de la tira para dar una concentración final de 3468 de 0,12, 0,16, 0,2 y 0,24 mg/ml.

10 Según puede observarse en la figura 4, el aumento de la cantidad de anticuerpo depurador reduce la señal en la zona de detección.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ensayo para la determinación de la hCG en una muestra de orina en un amplio intervalo de concentraciones, que comprende un primer ensayo para la hCG y un segundo ensayo para la hCG, en el que:
- 5 el primer ensayo para la hCG comprende una primera vía de flujo con una única zona de detección del primer ensayo y un reactivo de unión a la hCG marcado movilizable, anterior a dicha zona de detección del primer ensayo; y el segundo ensayo para la hCG comprende una segunda vía de flujo con una única zona de detección del segundo ensayo, un reactivo de unión a la hCG marcado movilizable, anterior a dicha zona de detección del segundo ensayo,
- 10 y un reactivo de unión depurador para la hCG sin marcar y movilizable, anterior a dicha zona de detección del segundo ensayo; en el que cada una las zonas de detección de los ensayos primero y segundo comprende independientemente un reactivo inmovilizado que es capaz de inmovilizar el respectivo reactivo de unión a la hCG marcado en presencia de la hCG; en el que dichos ensayos primero y segundo se proporcionan en sustratos separados o en un sustrato común pero con las vías primera y segunda de flujo aisladas fluidicamente entre sí;
- 15 en el que la inmovilización de los reactivos de unión a la hCG marcados en las zonas de detección proporciona una indicación de la hCG en dicha muestra líquida; y en el que el primer ensayo proporciona una indicación de la hCG en un primer intervalo de concentraciones y el segundo ensayo proporciona una indicación de la hCG en un segundo intervalo de concentraciones mayores, y en el que además el dispositivo comprende:
- 20 (a) un sistema de iluminación y detección para iluminar y detectar el reactivo de unión óptico marcado en las zonas de detección;
- (b) un sistema computacional para calcular un nivel de la hCG o un valor correspondiente al nivel de la hCG;
- 25 (c) un sistema de visualización para visualizar un resultado de la prueba de ensayo;
- (d) un valor umbral de base almacenado, en el que un nivel de la hCG correspondiente a un valor por debajo del umbral de base almacenado indica la ausencia de embarazo y en el que un nivel de la hCG correspondiente a un valor en o por encima del umbral de base almacenado indica un embarazo;
- 30 (e) dos valores umbral almacenados adicionales primero y segundo, en el que un nivel de la hCG correspondiente a un valor inferior o igual a un primer valor umbral indica un nivel de embarazo en un primer intervalo, un nivel de la hCG correspondiente a un valor superior al segundo umbral indica un nivel de embarazo en un tercer intervalo y un nivel de la hCG correspondiente a un valor superior o igual al primer umbral pero inferior al segundo umbral indica un nivel de embarazo en un segundo intervalo, en el que el sistema de visualización es capaz de indicar un estado sin embarazo o un estado de embarazo y la edad gestacional.
- 35
2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los intervalos primero y segundo de concentraciones se solapan.
- 40
3. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer ensayo es un ensayo para la hCG de mayor sensibilidad y el segundo ensayo es un ensayo para la hCG de menor sensibilidad.
- 45
4. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las vías primera y/o segunda de flujo comprenden un soporte poroso.
5. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el soporte poroso es un soporte poroso de flujo lateral.
- 50
6. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo de unión a la hCG marcado movilizable y el reactivo de unión depurador del segundo ensayo se unen respectivamente a unas regiones primera y segunda de unión de la hCG y la zona de detección del segundo ensayo comprende un reactivo de unión inmovilizado para dicha segunda región de unión de la hCG.
- 55
7. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo de unión a la hCG marcado movilizable y el reactivo de unión depurador del segundo ensayo se proporcionan en la misma región.
- 60
8. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada uno de los reactivos de unión a la hCG marcados movilizables de los ensayos primero y segundo está marcado con una partícula ópticamente detectable.
9. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un receptor de muestras poroso común.
- 65
10. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo de unión

depurador del segundo ensayo es capaz de unirse a la subunidad β de la hCG y el reactivo de unión marcado movilizable del segundo ensayo es capaz de unirse a la subunidad α de la hCG.

5 11. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los reactivos inmovilizados en las zonas de detección de los ensayos primero y segundo son reactivos de unión a la hCG inmovilizados.

10 12. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que cada uno de los reactivos inmovilizados en las zonas de detección de los ensayos primero y segundo es capaz de inmovilizar el respectivo reactivo de unión a la hCG marcado por medio de un complejo entre el reactivo de unión a la hCG marcado, la hCG y un segundo reactivo de unión a la hCG.

15 13. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12, en el que los reactivos inmovilizados en las zonas de detección de los ensayos primero y segundo son independientemente estreptavidina o antibiotina.

14. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un alojamiento, en el que los ensayos primero y segundo se proporcionan dentro de dicho alojamiento.

20 15. El uso de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la determinación de un embarazo, así como la edad gestacional de una mujer en unidades de semanas, a partir de una muestra de orina de dicha mujer.

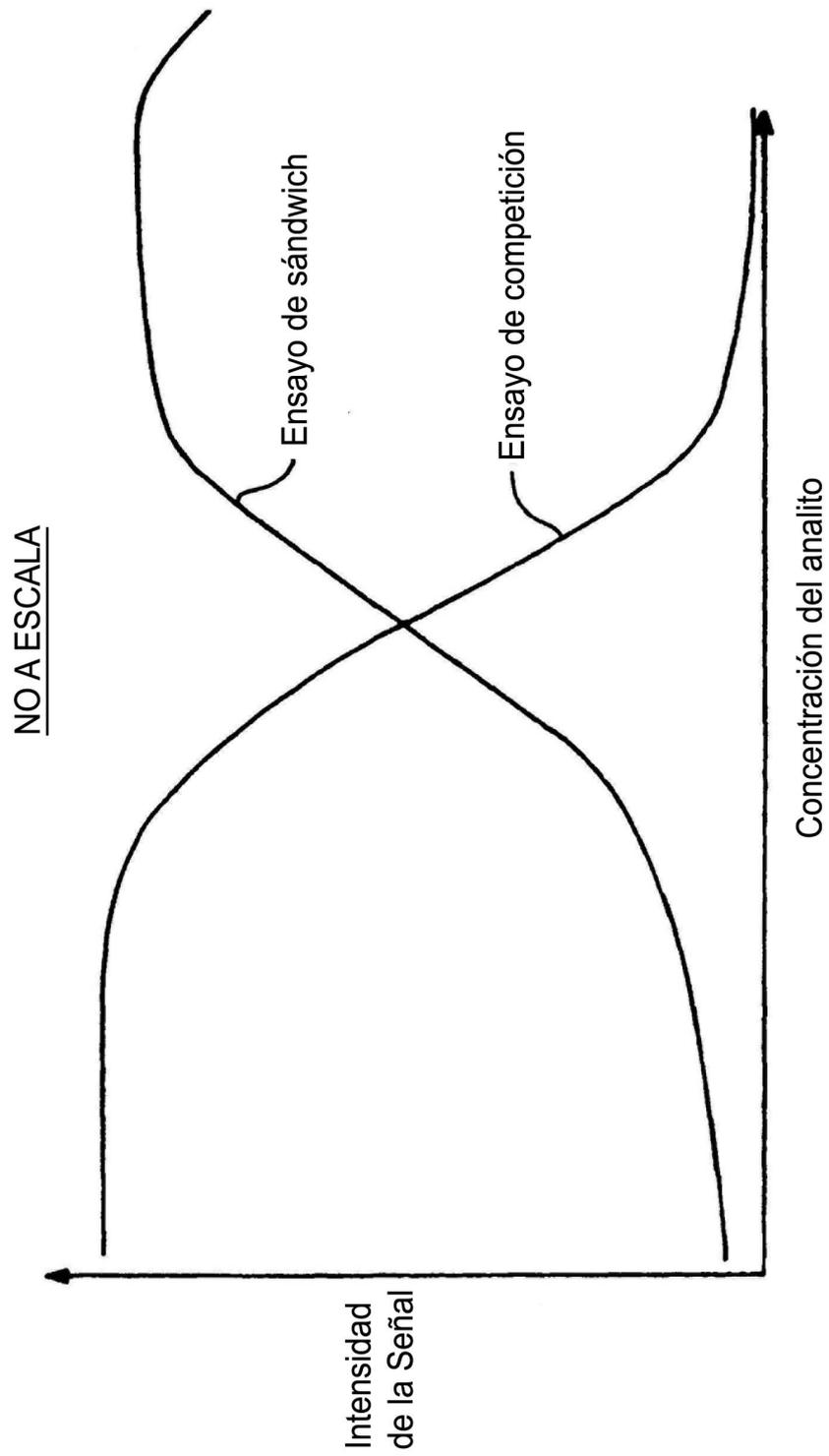


Fig. 1

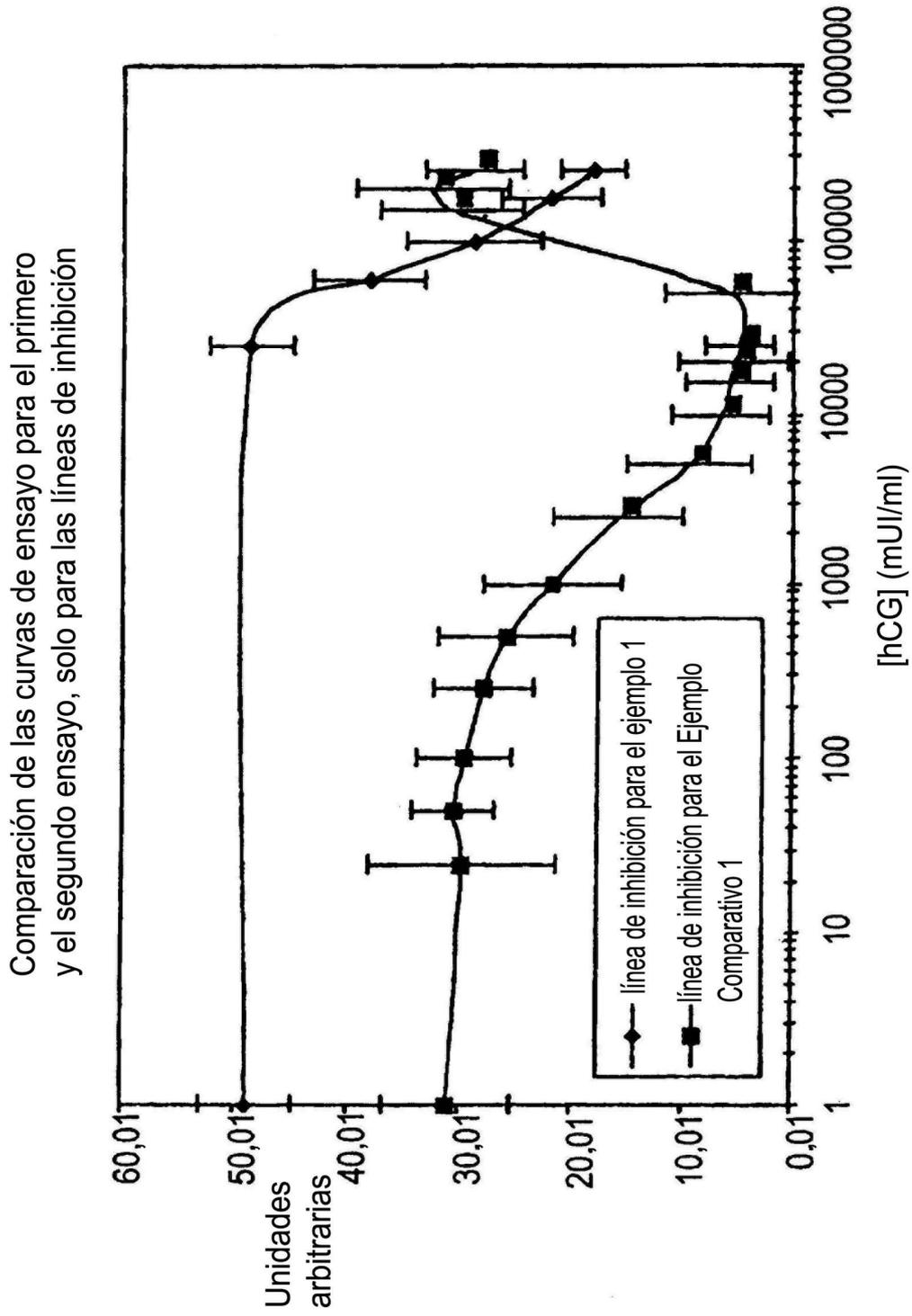


Fig. 2

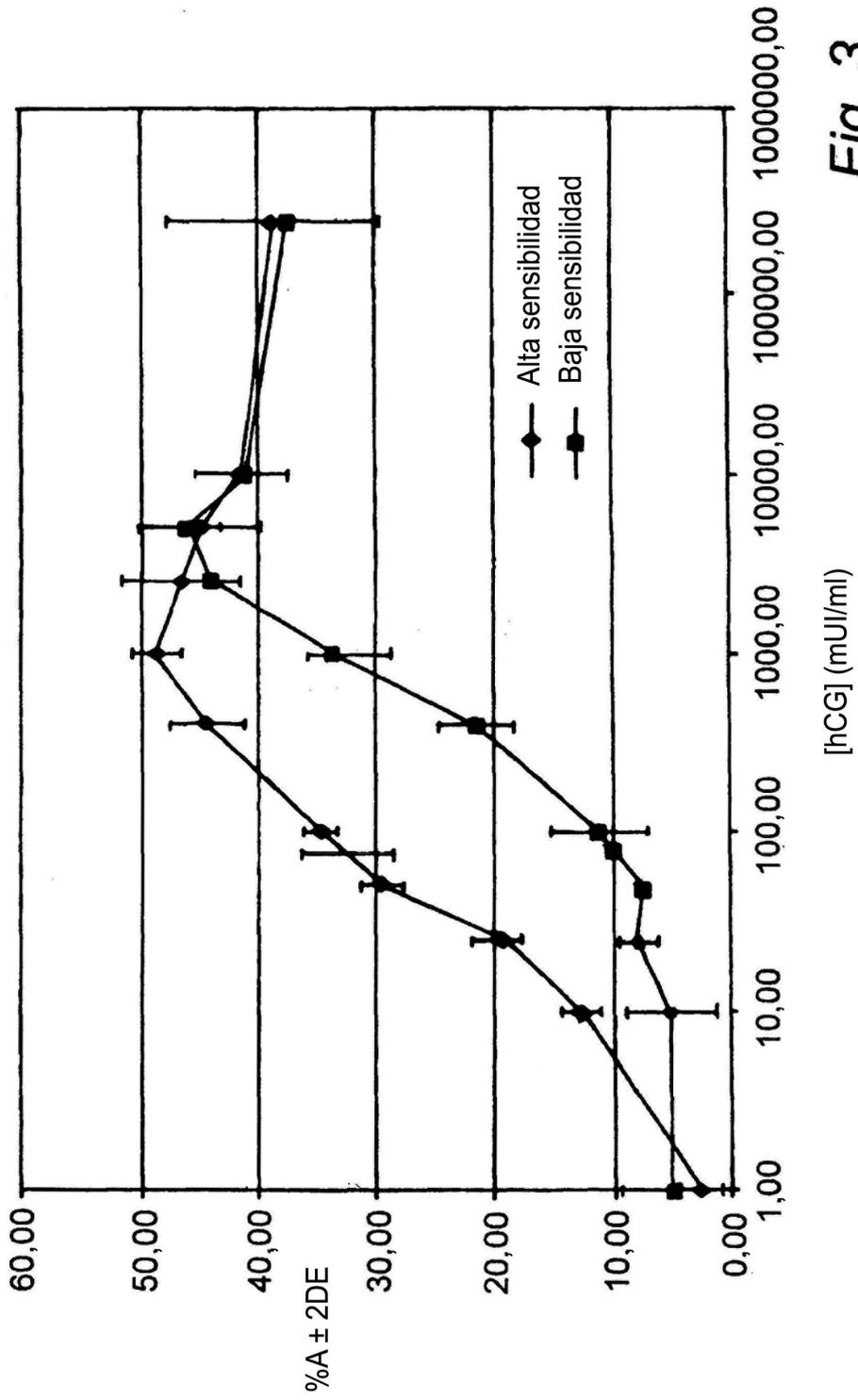


Fig. 3

Comparación de la concentración del depurador 3468 libre

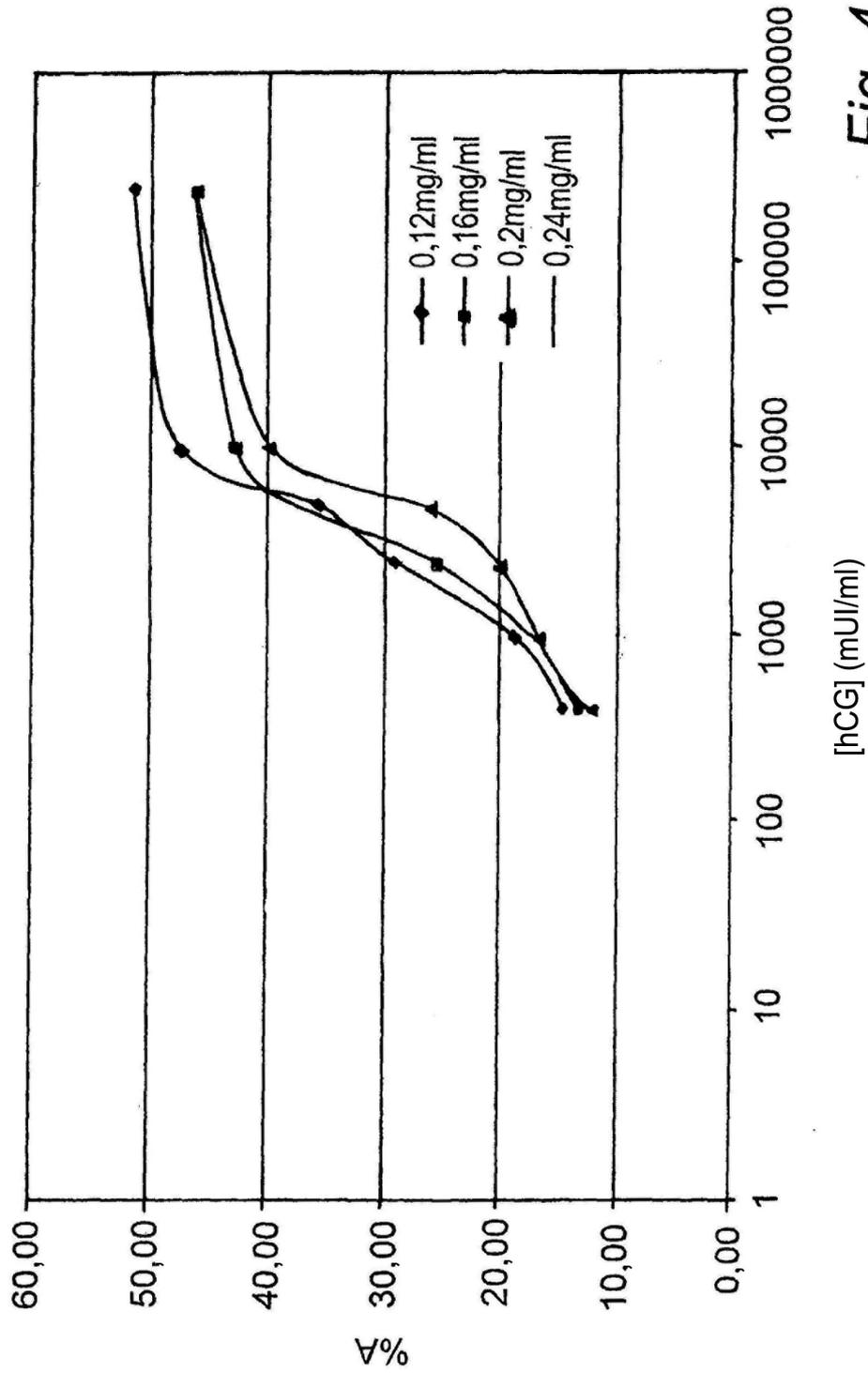


Fig. 4