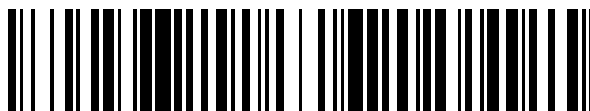


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 742**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2009** **E 09757809 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014** **EP 2294427**

54 Título: **Lector, dispositivo y método de ensayo para medir la HCG**

30 Prioridad:

04.06.2008 GB 0810142

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

29.05.2014

73 Titular/es:

ALERE SWITZERLAND GMBH (100.0%)
Bahnhofstrasse 28
6300 Zug, CH

72 Inventor/es:

ELLIS, JAYNE y
MARSHALL, JAYNE

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 463 742 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

Lector, dispositivo y método de ensayo para medir la HCG

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un lector, dispositivo y método de ensayo para proporcionar un tiempo desde la concepción.

10 Antecedentes de la invención

En el sistema reproductor femenino, el ciclo menstrual es un ciclo recurrente de cambios fisiológicos y es necesario para la reproducción que se produce en las mujeres en edad reproductiva. Los ciclos menstruales se cuentan desde el primer día de flujo menstrual, dado que el inicio de la menstruación se corresponde estrechamente con el ciclo hormonal y porque el sangrado menstrual es una situación fácilmente identificable para la persona en cuestión. El ciclo menstrual se puede dividir en varias fases, y la duración de cada fase varía de mujer a mujer y de ciclo a ciclo. Las fases, así como sus valores medios, son típicamente los siguientes: la fase menstrual, días 1-4; la fase folicular (también conocida como fase proliferativa), días 5-13; la ovulación, día 14; la fase lútea, día 15-26 y la fase isquémica, días 27-28.

La fase folicular es la fase del ciclo menstrual durante la cual maduran los folículos presentes en el ovario. Gracias a la influencia de un aumento de la hormona estimulante del folículo (FSH), se movilizan entre cinco y siete folículos ováricos terciarios para su entrada en el próximo ciclo menstrual. A medida que maduran, los folículos secretan cantidades crecientes de estradiol. Cuando el óvulo ha madurado, segrega suficiente estradiol para desencadenar la liberación aguda de la hormona luteinizante (LH). En el ciclo promedio, este «aumento de la LH» comienza alrededor del día 12 del ciclo y puede durar unas 48 horas. La liberación de LH hace madurar al óvulo y debilita la pared del folículo del ovario. Este proceso conduce a la ovulación. Los niveles de estrógenos siguen aumentando y alcanzan su punto más alto justo antes de que comience el aumento de la LH. La mayoría de las fuentes coinciden en que la ovulación ocurre normalmente 24-48 horas después del inicio del aumento de la LH, por lo general alrededor de 36 horas después del aumento de la LH.

La fase lútea es la última fase del ciclo menstrual y comienza con la formación del cuerpo lúteo y termina o bien en el embarazo o bien en la luteólisis. La principal hormona que controla de esta etapa es la progesterona, que es significativamente más alta durante la fase lútea que durante otras fases del ciclo. La duración de la fase folicular, y en consecuencia la duración del ciclo menstrual, puede variar ampliamente; algunas mujeres tienen una fase folicular de 10 días, otras de 16 días, mientras que el promedio es de 14 días. No obstante, la fase lútea casi siempre dura el mismo número de días en cada mujer. La vida del esperma normal dentro de una mujer oscila entre 1 y 5 días. El período más fértil (el tiempo durante el cual la relación sexual es más probable que tenga como resultado el embarazo) abarca el tiempo desde unos 5 días antes de la ovulación hasta 1-2 días después de la ovulación. En un ciclo promedio de 28 días con una fase lútea de 14 días, esto corresponde a la segunda y el comienzo de la tercera semana del ciclo.

Después de la concepción, la placenta secreta β -hCG y señala al cuerpo lúteo que continúe la secreción de progesterona, manteniendo de esa manera el revestimiento grueso (endometrio) del útero. La secreción de β -hCG continúa hasta que la placenta es capaz de secretar su propia progesterona. El nivel de la hormona hCG en el cuerpo humano se duplica aproximadamente cada 2,2 días durante el primer trimestre del embarazo. Si el óvulo no es fecundado, y por lo tanto no se produce β -hCG, el cuerpo lúteo deja de secretar progesterona y se desintegra. En ausencia de progesterona, el revestimiento del útero es expulsado a través de la vagina (menstruación) y el ciclo menstrual comienza una vez más. Los niveles detectables de hCG en la orina comienzan en 5 mUI/ml durante la primera semana de gestación y se elevan hasta 100.000 mUI/ml entre 2 y 3 meses. Los valores disminuyen a entre el 10 % y el 15 % de las concentraciones máximas durante el segundo y el tercer trimestres. Por lo tanto, existe un intervalo muy amplio de valores de concentración del analito.

Existe una amplia gama de dispositivos de ensayo sencillos para determinar los niveles de hCG en la orina, tanto para venta al público en general como para uso profesional. Tales dispositivos se utilizan para determinar si una mujer está embarazada o no mediante la medición de la presencia o ausencia de la hormona β -hCG. Hoy en día, las mujeres suelen adquirir un dispositivo de este tipo si sospechan que pueden estar embarazadas antes de consultar a un profesional sanitario.

Sin embargo, una vez que una mujer confirme o sospeche que está embarazada, es útil para ella saber de cuántas semanas está embarazada. Con este dato, la mujer, el médico o la comadrona pueden planificar el futuro gracias a la estimación de la fecha de nacimiento del bebé, además de poder elaborar una programación con otras fechas clave, tal como la ecografía de las doce semanas. Normalmente, el médico o la comadrona determinarán el tiempo transcurrido del embarazo tras preguntar a la mujer por el primer día de su último período menstrual basado en un ciclo estándar de 28 días. Si bien se sabe que la fase lútea tiene una duración bastante constante de alrededor de 15 días, la fase folicular puede variar ampliamente entre, por ejemplo, 9 y 28 días. La duración de los ciclos puede

variar ampliamente de una mujer a otra. Por lo tanto, la exactitud de la determinación del tiempo transcurrido del embarazo basándose en el primer día de su último período puede ser muy variable. Además, esto supone que la mujer ha dado la fecha correcta de su último período menstrual. Por consiguiente, las estimaciones realizadas por el médico sobre el tiempo transcurrido del embarazo únicamente sobre la base de los niveles de hCG pueden resultar bastante inexactas. Mientras que un ensayo típico de la hCG puede proporcionar una indicación de si la sujeto está embarazada o no embarazada, no puede ofrecer por sí mismo ninguna indicación adicional del tiempo transcurrido del embarazo sin disponer de información más específica, tal como la fecha de la última ausencia de menstruación.

Existe una amplia gama de dispositivos de inmunoensayo sencillos para medir los niveles de analitos tales como la hCG en la orina, por ejemplo, el comercializado con el nombre de Unipath Clearblue^{RTM}. Asimismo, se describen dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral en el documento EP291194. Aunque tales dispositivos son capaces de indicar la presencia o la ausencia de hCG por encima o por debajo de un cierto umbral, típicamente 10 o 25 mUI, e indicar si una sujeto está embarazada o no embarazada, no son capaces de determinar los niveles del analito en un amplio intervalo de analito, tales como los niveles de hCG comprendidos entre 10 y 250.000 mUI.

En principio, es posible medir los niveles de hCG en un amplio intervalo usando un sencillo dispositivo de tipo de flujo lateral. Sin embargo, una mera indicación de la cantidad de hCG en unidades basadas en concentración tendría una utilidad limitada para un profesional sanitario, sin disponer de información en cuanto a la fecha de la última ausencia de período menstrual, y casi con seguridad carecería de toda utilidad para el usuario lego.

Se han desarrollado y comercializado dispositivos de flujo lateral, tales como los descritos en el documento EP291194, para la detección de una serie de analitos en muestras líquidas. 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, situado 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.

De manera alternativa, 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. De manera alternativa, el dispositivo de ensayo puede emplear una reacción de inhibición, en la 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 tipo sándwich. Sin embargo, un ensayo de tipo 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 tipo sándwich muestra niveles crecientes de la señal con el aumento del analito hasta el punto de que, para mayores niveles 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 prozona. Por lo tanto, especialmente si se requiere un resultado del ensayo cuantitativo o semicuantitativo, los inmunoensayos de tipo sándwich presentan un intervalo de ensayo limitado debido a que la cantidad o la intensidad de la señal observada para mayores niveles del analito pueden ser iguales o incluso inferiores a las observadas para menores niveles del analito.

Un ensayo de competición o de inhibición proporciona típicamente una señal elevada para niveles nulos 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 tipo sándwich para medir un analito en un amplio intervalo puede plantear problemas con respecto al efecto prozona. Elevados niveles del analito comienzan a producir una disminución de la señal del ensayo. Los ensayos de competición o de inhibición tienen como resultado 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 métodos de ensayo anteriores no son adecuados para medir los niveles de un analito en un amplio intervalo.

Se ha propuesto una serie de dispositivos de ensayo para medir analitos en un amplio intervalo. Nepomnaschy et al. (Human Reproduction, Vol. 23, 2008, pp. 271-277) dan a conocer un ensayo inmunorradiométrico con sefaroza para estimar el tiempo hasta la implantación de un embrión en la primera semana de gestación.

El documento US 2004/0197820 da a conocer un dispositivo de ensayo con un soporte poroso de flujo transversal para reducir el efecto prozona que comprende una zona de detección, en el que el dispositivo puede incluir una zona de calibración posterior.

- 5 El documento WO 2006/100415 estima el tiempo hasta la implantación mediante un dispositivo con zonas de prueba de un intervalo de concentraciones.

10 El documento US 2006/0019404 da a conocer un dispositivo de ensayo con un amplio intervalo dinámico que comprende una tira de prueba de flujo lateral que comprende una pluralidad 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.

15 El documento EP 462376 da a conocer 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 tanto en el sitio de recuperación del conjugado como en el sitio de captura.

20 Los dispositivos de ensayo de tipo de flujo lateral que utilizan un reactivo de unión marcado ópticamente detectable para el analito o análogo del analito representan el dispositivo de ensayo preferido para realizar unos ensayos sencillos y desechables. Sin embargo, se puede emplear un gran número de dispositivos y métodos de ensayo diferentes para detectar analitos. Por ejemplo, el método de ensayo puede comprender un reactivo de unión para el analito marcado con una enzima, un marcador radiactivo, electroquímicamente activo o magnético. El analito se
25 puede detectar por medio de una enzima y un mediador electroquímico. Se comercializa una amplia gama de dispositivos sencillos para la detección de glucosa que comprende la enzima glucosa oxidasa y un mediador de electrones tal como ferro/ferricianuro. Los dispositivos y métodos de tipo biosensor acústico, que, por ejemplo, miden la frecuencia resonante de un cristal de cuarzo después de un evento de unión, permiten la determinación de un
30 analito sin necesidad de proporcionar un reactivo de unión marcado.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la invención da a conocer un lector de resultados de ensayo adaptado para calcular una estimación cuantitativa del lapso de tiempo desde la concepción en un sujeto mamífero hembra, siendo
35 el lector de resultados de ensayo tal como se define en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas a este documento.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención da a conocer un dispositivo de ensayo adaptado para proporcionar una estimación cuantitativa del lapso de tiempo desde la concepción en un sujeto mamífero hembra,
40 siendo el ensayo tal como se define en la reivindicación 2 de las reivindicaciones adjuntas a este documento.

En un tercer aspecto, la invención da a conocer un método para determinar una estimación cuantitativa del lapso de tiempo desde la concepción en un sujeto mamífero hembra, siendo el método tal como se define en la reivindicación
45 3 de las reivindicaciones adjuntas a este documento.

Un umbral de analito puede ser único para un tipo particular de ensayo o dispositivo de ensayo. Un umbral de analito puede ser un valor de la señal que corresponda a un tiempo desde la concepción.

50 Un valor de umbral de analito correspondiente a un ensayo o dispositivo de ensayo particular se puede obtener a partir del análisis de un primer conjunto de datos que comprende los niveles de hCG medidos como una función del tiempo desde la concepción, y de un segundo conjunto de datos relativo a los niveles de señal medidos para ese tipo particular de ensayo o dispositivo de ensayo como una función del nivel de hCG.

55 El primer conjunto de datos se puede obtener a partir de la medición de los niveles de hCG con el tiempo desde la concepción en una cohorte de sujetos mamíferos hembras embarazadas.

El segundo conjunto de datos puede consistir en uno o (preferentemente) más puntos de datos.

60 El tiempo transcurrido desde la concepción se define con respecto a un evento en particular que se produce durante el ciclo menstrual antes de la concepción. Este evento es el momento en el que se produjo el aumento de la LH.

El momento de la concepción puede ser una fecha de concepción.

65 La fecha de la concepción se puede definir, por ejemplo, como la fecha del aumento de la LH + x día(s), donde x es un número.

La muestra líquida es orina.

El primer conjunto de datos se puede obtener a partir de la medición de los niveles de hCG con el tiempo de muestras de orina recogidas en una cohorte de mujeres embarazadas que registraron la fecha de su aumento de la LH en su ciclo menstrual anterior.

El segundo conjunto de datos se puede obtener realizando pruebas con un tipo particular de ensayo o dispositivo de ensayo con concentraciones conocidas de hCG y midiendo los valores de la señal para cada nivel de hCG. Es posible realizar pruebas con una serie de dispositivos de ensayo en cada nivel de hCG con el fin de aumentar el número de puntos de datos.

A partir de estos primer y segundo conjuntos de datos, es posible obtener uno o más valores de umbral, que son valores de la señal correspondientes a un tiempo desde la concepción. Con el fin de aumentar el número de puntos de datos, se puede generar un conjunto de datos simulados, si fuese necesario. A partir del primer y segundo conjuntos de datos y/o del conjunto de datos simulados, se puede elegir un conjunto de valores de umbral estadísticamente optimizados para lograr la mayor exactitud clínica de acuerdo con los criterios de clasificación del tiempo desde de la concepción preseleccionados, por ejemplo, una exactitud mayor que el 80 % en un intervalo particular de clasificación del tiempo.

Debido a la variación natural de los niveles de hCG entre las mujeres embarazadas, se observaron diferentes valores de hCG en cada punto de tiempo en el primer conjunto de datos, que tenía una distribución particular en cada tiempo medido. Por consiguiente, un valor de umbral de analito elegido representa un valor promedio de la señal obtenida para un conjunto de datos particular. Un primer conjunto de datos diferente obtenido a partir de una cohorte diferente de mujeres puede derivar en un umbral de analito diferente. Los valores de umbral se eligieron sobre la base de que mostraron una exactitud clínica óptima de cara a proporcionar un tiempo desde la concepción.

Con el fin de determinar la exactitud de los valores de umbral, entonces el uno o más valores de umbral elegidos se pueden usar, por ejemplo, desarrollando un dispositivo de ensayo con los valores de umbral almacenados, con el fin de clasificar muestras de orina reales obtenidas de mujeres embarazadas. Si fuese necesario, se pueden refinar los valores de umbral con el fin de optimizar la precisión clínica de la clasificación.

El análisis estadístico de la primera serie de datos se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando un modelo exponencial. El análisis estadístico de la primera serie de datos se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando una curva logística de cuatro parámetros. Se pueden emplear otros tipos de modelos estadísticos conocidos para modelar y analizar los datos.

En el ejemplo 2 expuesto más adelante se describe un método de ejemplo que se puede usar para determinar uno o varios valores de umbral para un ensayo o dispositivo de ensayo. El ejemplo 2 describe el método por el cual se asignaron los valores de umbral a los dispositivos de ensayo preparados de acuerdo con el ejemplo 1. No obstante, el método se podría aplicar fácilmente a otros tipos de dispositivos de ensayo.

El método, el lector y el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención pueden comprender, además, otro umbral de medición del analito indicativo de otro tiempo desde la concepción. De la misma manera, el conjunto de datos se puede utilizar para proporcionar el otro umbral de medición del analito. El otro umbral de analito se puede almacenar en el dispositivo o lector.

El dispositivo de ensayo o lector puede comprender dos o más umbrales de analito almacenados, es decir, tres, cuatro o cinco, correspondientes a los respectivos períodos de tiempo desde la concepción. Como alternativa a proporcionar una pluralidad de umbrales de medición individuales, el dispositivo de ensayo integral o el lector para uso con un dispositivo de ensayo pueden comprender un algoritmo almacenado que comprende una fórmula matemática calculada para ajustar un conjunto de datos en relación con los valores de la señal obtenidos para ese dispositivo de ensayo equivalente como una función del nivel de hCG y, por lo tanto, proporcionar para cualquier valor de la señal un tiempo desde la concepción.

El método, el lector y el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención utilizan un umbral mínimo de embarazo (PDTmin), en donde una señal de medición del analito menor que el umbral mínimo de embarazo es indicativa estar «no embarazada» y en donde una señal de medición del analito mayor que el umbral mínimo de embarazo es indicativa de estar «embarazada». El resultado del ensayo se puede proporcionar a un tiempo $t < \text{FDT}$, en donde FDT es el tiempo completo de desarrollo del ensayo, es decir, el tiempo máximo durante el cual se mide el ensayo.

El medio de visualización puede presentar una indicación de embarazada y un tiempo desde la concepción.

El tiempo desde la concepción se puede proporcionar como un intervalo de tiempo, por ejemplo 2-3 semanas desde la concepción.

El primer umbral de analito corresponde a un tiempo desde la concepción y un segundo umbral de analito

corresponde a un tiempo desde la concepción posterior.

Así, para un valor de la señal del analito menor que el primer umbral, pero mayor que el umbral mínimo de embarazo, se indica un tiempo desde la concepción en un primer intervalo de tiempo, un valor de la señal del analito mayor que el segundo umbral se indica como un tiempo desde la concepción en un tercer intervalo de tiempo, y un valor de la señal del analito mayor que o igual al primer umbral pero menor que o igual al segundo umbral se indica dentro de un segundo intervalo de tiempo que se produce entre el primer y el tercer intervalos de tiempo.

El dispositivo de ensayo comprende un primer y un segundo umbrales de analito que corresponden, respectivamente, a 14 días desde la concepción y 21 días desde la concepción. Así pues, el resultado mostrado por la pantalla puede ser, por ejemplo, 1-2 semanas de embarazo para un valor de la señal del analito menor que el primer umbral de analito, pero mayor que el umbral mínimo de embarazo, 3+ semanas de embarazo para un valor de la señal del analito mayor que el segundo umbral de analito y 2-3 semanas de embarazo para un valor de la señal del analito mayor que o igual al primer umbral pero menor que o igual al segundo umbral.

El valor de umbral mínimo de embarazo se puede elegir dependiendo de la sensibilidad requerida del ensayo y, por lo tanto, por ejemplo, se puede configurar de manera que corresponda a un nivel de hCG correspondiente a 5 mUI, 10 mUI, 15 mUI o 25 mUI o valores entre los anteriores.

De acuerdo con una forma de realización, el dispositivo de ensayo o lector comprende un umbral mínimo de embarazo almacenado (PDTmin), un primer umbral de analito (PDTmid) y un segundo umbral de analito (EPDTmax). El primer umbral de analito puede corresponder a 14 días desde la concepción y el segundo umbral de analito puede corresponder a 21 días desde la concepción. Para las señales de medición de analito que sean mayores que EPDTmax, el resultado del ensayo se puede proporcionar a un tiempo $t < FDT$.

El tiempo desde la concepción toma como referencia una fecha grabada, que coincide con el momento del aumento de la LH. El momento del aumento de la LH es particularmente útil como referencia de tiempo para el dispositivo y el método de acuerdo con la invención, ya que se produce de manera invariable alrededor de 36 horas antes de la ovulación y es un factor pronóstico relativamente preciso para medir el momento de la ovulación.

La fecha de la concepción se puede definir como la fecha del aumento de la LH + 1 día.

El medio de visualización puede proporcionar una indicación «embarazada» o «no embarazada» mediante la respectiva presentación de las palabras «EMBARAZADA» O «NO EMBARAZADA» en cualquier idioma, tipo de letra o formato apropiado. De manera alternativa, una indicación embarazada o no embarazada se puede indicar mediante un signo o símbolo apropiado, tal como «+» o «-».

Un resultado dado por el dispositivo de ensayo integral puede diferir de un resultado dado por un profesional sanitario, en el caso de que la fecha del embarazo se haya basado en un ciclo típico de 28 días, basado en el primer día del último período.

Por consiguiente, el dispositivo de ensayo o lector pueden incluir además información relativa a la fecha de la concepción hasta la fecha del embarazo sobre la base de un ciclo típico de 28 días, basado en el primer día del último período. Esta información se puede proporcionar, por ejemplo, en el envase en el que se incluye el dispositivo de ensayo integral o el lector, o en un folleto de información suministrado con el dispositivo.

Típicamente, en el caso de una indicación de un tiempo desde la concepción para una indicación de embarazada dado por el dispositivo, se indicará ese tiempo más 2 semanas como la fecha del embarazo tal como la daría el profesional sanitario.

Por ejemplo, la información se puede presentar de la siguiente manera:

Tiempo desde la concepción indicado por el lector o dispositivo de ensayo	Cómo determinará el médico la fecha de su embarazo en base a un ciclo de 28 días
Su resultado es embarazada y concibió aproximadamente hace 1-2 semanas	3-4 semanas
Su resultado es embarazada y concibió aproximadamente hace 2-3 semanas	4-5 semanas
Su resultado es embarazada y concibió hace más de 3 semanas	Más de 5 semanas

El dispositivo de ensayo o lector podría proporcionar la fecha de embarazo que daría el médico sobre la base de un ciclo de 28 días, en lugar de indicar un tiempo desde la concepción, o además de esto.

En el método de acuerdo con la invención, el ensayo mediante el cual se pueden determinar los niveles de hCG puede ser, por ejemplo, un analizador de inmunoensayo de laboratorio o una placa de ELISA de 96 pocillos.

- 5 El dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención puede comprender convenientemente un inmunoensayo de tipo flujo transversal o flujo lateral capaz de medir la hCG en un amplio intervalo de analito. Se contemplan otros tipos de ensayo, tales como un inmunoensayo de biosensor acústico o un inmunoensayo de tipo microfluídico.

10 En particular, el ensayo es un ensayo de flujo lateral. El dispositivo de ensayo puede ser de un solo uso, es decir, desechable.

Debido al aumento de la hCG durante el tiempo desde la concepción, cuando los niveles de hCG comienzan en 5 mUI/ml durante la primera semana de gestación y se elevan hasta 100.000 mUI/ml a los 2 a 3 meses, el dispositivo de ensayo tiene que ser capaz de medir la hCG en un amplio intervalo de analito.

15 El dispositivo de ensayo puede comprender una única vía de flujo de ensayo capaz de medir la hCG, o dos o más vías de flujo de ensayo, cada una de las cuales sea capaz de medir la hCG en un intervalo de concentración diferente.

20 La vía de flujo de ensayo puede comprender un soporte poroso que comprenda una zona de detección para la detección de un reactivo de unión marcado para el analito hCG.

25 La vía de flujo de ensayo puede comprender un reactivo de unión marcado movilizable (es decir, movilizable al entrar en contacto con una muestra líquida, tal como orina) que es capaz de ser capturado o inmovilizado en la zona de detección. El reactivo de unión marcado se puede disponer delante de la zona de detección. El reactivo de unión marcado se puede presentar en estado seco. La zona de detección puede comprender un reactivo de unión inmovilizado que es capaz de inmovilizar un reactivo de unión marcado.

30 El término reactivo de unión se refiere a un miembro de un par de unión. El reactivo de unión puede comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, capaz de unirse a la hCG. El analito hCG comprende una subunidad alfa idéntica a la de la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH) y una subunidad beta exclusiva de la hCG. Se pueden usar anticuerpos dirigidos contra las subunidades alfa y beta para unirse a la hCG en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich.

35 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 (p. ej., ribonucleasa, el péptido S y la proteína S de la ribonucleasa) y similares. Además, los pares de unión
40 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
45 presente invención incluyen marcadores que producen señales por medios químicos o físicos, por ejemplo, son ópticamente detectables. Tales marcadores incluyen enzimas y sustratos, cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, especies electroactivas, moléculas colorantes, marcadores radioactivos y marcadores particulados. El propio analito puede ser intrínsecamente capaz de producir una señal detectable. El marcador puede estar unido covalentemente al reactivo de unión.

50 El marcador puede comprender una partícula tal como oro, plata, partículas no metálicas coloidales tales como selenio o telurio, partículas teñidas o coloreadas tales 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
55 comercialmente como Foron Blue SRP (Sandoz) y Resolin Blue BBLS (Bayer). Los marcadores poliméricos adecuados pueden elegirse entre una gama de polímeros sintéticos tales como poliestireno, poliviniltolueno, poliestireno-ácido acrílico y poliacroleína. Los monómeros usados son normalmente insolubles en agua y se emulsionan en un tensioactivo acuoso, de manera 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
60 esféricas. De acuerdo con un una realización de ejemplo, el marcador es una partícula polimérica azul.

El término «vía de flujo de ensayo» se refiere a un sustrato que es capaz de transportar un líquido desde una primera posición hasta una segunda posición y puede ser, por ejemplo, un canal capilar, una vía microfluídica o un
65 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 para circulación de fluidos. Los materiales de soporte porosos pueden ser iguales o diferentes. La primera y la segunda

vías de flujo se pueden disponer en sustratos distintos o se pueden disponer 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, el primer y el segundo ensayos se pueden disponer en el mismo soporte poroso, de tal manera que la primera y la segunda vías de flujo estén aisladas entre sí. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante el corte con láser de partes del soporte poroso para hacerlo no poroso, con lo que se separan la primera y la segunda vías de flujo. Como otra alternativa adicional, la primera y la segunda zonas de detección se pueden disponer en la misma vía de flujo en una disposición sustancialmente yuxtapuesta, de manera que ninguna sea posterior a la otra.

En particular, la vía de flujo puede comprender un soporte poroso de flujo lateral. El reactivo de unión marcado y la zona de detección del ensayo se pueden disponer respectivamente sobre diferentes materiales de soporte. Los materiales adecuados que se puede emplear 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 preferentemente nitrocelulosa. Esto tiene la ventaja de que se puede inmovilizar firmemente un reactivo de unión 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 químico, por ejemplo, mediante CNBr, carbonildiimidazol o cloruro de tresilo.

El ensayo se puede presentar en forma de una tira de prueba.

El dispositivo de ensayo puede comprender una zona de control. La zona de control puede estar dispuesta después de la zona de detección. El dispositivo de ensayo puede comprender además un reactivo de unión marcado para la zona de control dispuesto delante de la zona de detección. La medición de la señal en la zona de control indica si 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 movilizado 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 se coloca típicamente después de la zona de detección. La zona de control puede comprender un reactivo de unión inmovilizado para un reactivo de unión marcado. El reactivo de unión marcado puede ser el mismo reactivo de unión que se une a la zona de detección o puede ser un reactivo de unión diferente. El reactivo de unión inmovilizado en la zona de control puede ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra una especie para un reactivo de unión marcado preparado en una especie, por ejemplo, un anticuerpo «dirigido contra ratón» si el anticuerpo marcado se ha derivado a partir de un hibridoma murino.

El dispositivo de ensayo o lector puede comprender un umbral de señal de control almacenado (CLT) en el que una señal medida en la zona de control se compara con el umbral de control para indicar si el ensayo se ha llevado a cabo satisfactoriamente.

El dispositivo de ensayo o lector puede comprender, además, un umbral de analito mínimo almacenado, de manera que si la señal de medición es menor que el umbral mínimo en un tiempo de umbral mínimo de analito, se determina que la señal de medición nunca alcanzará el umbral de medición en el tiempo completo de desarrollo del ensayo. Esto representaría el caso de una muestra líquida que tenga una concentración de analito muy baja o inexistente. En este caso, se puede proporcionar una indicación negativa precoz, es decir, una indicación de la ausencia de analito o de la ausencia de analito por encima de cierto nivel mínimo, en un tiempo $t < \text{FDT}$.

El dispositivo de ensayo y el lector pueden comprender uno o más de los siguientes elementos: una unidad central de procesamiento (CPU) o microcontrolador; uno o más LED; uno o más fotodetectores; una fuente de alimentación; y los circuitos eléctricos asociados. La fuente de alimentación puede ser una batería o cualquier otra fuente de alimentación adecuada (p. ej., una célula fotovoltaica). Convenientemente, la CPU o el microcontrolador estarán programados de manera que determinen, a partir de la salida de los fotodetectores, la tasa o la magnitud de acumulación de la señal y comparen esta con los umbrales de control y de medición.

El dispositivo de ensayo y el lector pueden comprender un medio de temporización mediante el cual se pueda medir el tiempo del ensayo y que permita determinar el momento de inicio de la medición del ensayo. El medio de temporización puede comprender, por ejemplo, un medio de indicación de la presencia de la muestra que permita detectar el momento en que se añade la muestra líquida al dispositivo, tal como un par de electrodos que sean capaces de detectar la presencia de la muestra líquida. De manera alternativa, los medios de temporización pueden estar constituidos como parte del medio de detección óptica, de manera que se empieza a cronometrar la medición del ensayo en el momento en el que el fotodetector determina que la muestra líquida ha alcanzado una zona particular de la vía de flujo del ensayo.

El dispositivo de ensayo y visualización pueden comprender, además, un medio de visualización para presentar el resultado del ensayo. El medio de visualización puede mostrar además información adicional, tal como un mensaje de error, datos personales, hora, fecha y un cronómetro que informa al usuario del tiempo durante el cual se ha medido el ensayo. La información mostrada por el ensayo puede estar indicada en palabras, números o símbolos,

en cualquier tipo de letra, alfabeto o idioma, por ejemplo, «positivo», «negativo», «+», «-», «embarazada», «no está embarazada», «consulte a su médico», «repetir la prueba».

El dispositivo de ensayo y el lector pueden comprender un medio de detección de la señal para determinar el nivel y/o la cantidad de especies marcadas presentes en las zonas de detección y de control. El medio de detección de la señal puede comprender un medio de detección óptica, tal como un fotodetector, para determinar la extensión y/o la cantidad de especies marcadas presentes. El dispositivo de ensayo puede comprender una o más fuentes luminosas, tales como un LED colocado para iluminar ópticamente las zonas. La luz procedente de la fuente luminosa ilumina las zonas respectivas y es o bien transmitida o bien reflejada hacia un fotodetector que registra la cantidad o intensidad de la luz transmitida o reflejada. La presencia del reactivo de unión marcado en las zonas influirá en la cantidad de luz que es o bien transmitida o bien reflejada, por lo que la medición de la luz en el fotodetector es indicativa de la presencia o de la cantidad del reactivo de unión marcado.

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 se puede iluminar 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, se pueden registrar una o más señales con el tiempo. Típicamente, las señales se expresarán como % de absorbancia (%A).

Cada zona de medición se ilumina típicamente con un único LED. Un fotodetector puede detectar luz de más de una zona de medición y, por lo tanto, luz reflejada de más de un LED. Esto se puede conseguir al llevar a cabo el método de iluminación secuencialmente, de manera que el dispositivo sea capaz de saber qué zona está reflejando la luz al fotodetector. El método de iluminación secuencial se puede repetir con una frecuencia fija o variable durante la duración del ensayo, de manera que se pueden monitorizar los niveles de la señal con el tiempo en cada zona.

El dispositivo de ensayo puede comprender un medio para detectar el momento de adición de la muestra líquida. Por ejemplo, se puede monitorizar el cambio de los niveles de luz detectados en una o más zonas para determinar si se ha aplicado una muestra líquida en el dispositivo y cuándo se ha aplicado. El cronometraje de la prueba de ensayo se puede iniciar automáticamente, por ejemplo, cuando la muestra líquida haya alcanzado una zona concreta.

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

El sistema típico de detección óptica e iluminación comprenderá al menos una fuente luminosa y al menos un fotodetector (tal 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. A los efectos 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. Con el propósito de facilitar una medición de la reflectancia, el soporte puede incluir un refuerzo posterior, tal como una capa reflectante blanca de plástico MYLAR®. De esta manera, 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 reflectante. 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 se haya de iluminar 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 una pluralidad de zonas, se puede medir el tiempo que necesita la muestra líquida para desplazarse entre las zonas.

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 se pueden corregir 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.

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 una prueba de ensayo es de 3 minutos.

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

Para cada ventana se puede calcular un cociente entre el valor medido cuando la zona de medición 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 medición está húmeda y se puede haber 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.

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 entre 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 se pueden evaluar de la siguiente manera:

$$\text{Cociente de referencia}_t = \frac{\text{valor de la ventana de referencia filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de referencia filtrado}_{\text{tiempo}=1}}$$

$$\text{Cociente de prueba}_t = \frac{\text{valor de la ventana de prueba filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de prueba filtrado}_{\text{tiempo}=1}}$$

$$\text{Cociente de control}_t = \frac{\text{valor de la ventana de control filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de control filtrado}_{\text{tiempo}=1}}$$

Cálculo de los valores del %A filtrados

Para cada punto temporal, t , los valores del %A se pueden calcular 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.

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

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

El dispositivo de ensayo puede comprender un ensayo de alta sensibilidad (HS) para la detección del analito en un intervalo de concentración inferior que comprende una zona de detección, y un ensayo de baja sensibilidad (LS) para la detección del analito en un intervalo de concentración superior, comprendiendo el dispositivo de ensayo una zona de prueba, una zona de referencia y una zona de control. Las señales medidas en las dos zonas, HS y LS, se pueden definir de la siguiente manera:

$$\text{Cociente HS}_t = \frac{\text{valor de la ventana de prueba HS filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de prueba HS filtrado}_{\text{tiempo}=1}}$$

$$\text{Cociente } LS_t = \frac{\text{valor de la ventana de prueba } LS \text{ filtrado}_{\text{tiempo}=0}}{\text{valor de la ventana de prueba } LS \text{ filtrado}_{\text{tiempo}=1}}$$

Los valores del %A filtrados para las zonas HS y LS se pueden definir de la siguiente manera:

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

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

Típicamente, los valores del %A serán aquellos obtenidos en el tiempo completo de desarrollo del ensayo, aunque se pueden determinar valores a tiempos $t < \text{FDT}$.

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 entre el cociente de la ventana de referencia y multiplicado por el 100 %.

Los valores de la señal de control y de medición se pueden presentar como %A, es decir, el valor de la señal con respecto a la señal medida en una zona de referencia.

De manera alternativa, los valores de la señal se pueden presentar como %R, es decir, un valor absoluto.

DETECCIÓN Y VALIDACIÓN DEL FLUJO

Detección del flujo

El cociente de ventana para cada ventana se puede usar 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 ,

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

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 de ensayo o lector y usarlos para clasificar el flujo de una muestra líquida a lo largo del soporte poroso de un dispositivo de ensayo. El dispositivo o lector puede mostrar cualquier error en el flujo.

El dispositivo de ensayo o lector puede comprender uno o más valores almacenados correspondientes a un tiempo de detección de flujo mínimo, $\text{FDT}_{\min}$, un tiempo de detección de flujo máximo, $\text{FDT}_{\max}$, un tiempo de tránsito de ventana mínimo, $\text{MTT}_{\min}$, y un umbral de detección de flujo, FDTh .

El dispositivo de ensayo o lector puede comprender uno o más valores almacenados adicionales, tales como un tiempo de desarrollo completo de ensayo (FDT) del ensayo, un tiempo de desarrollo mínimo del ensayo (MDT) y un umbral máximo de decisión temprana de embarazo (EPDTmax).

El resultado del ensayo solamente se puede proporcionar después de que haya transcurrido un tiempo de desarrollo mínimo del ensayo (MDT). El MDT puede ser cero.

Un umbral o valor almacenado se puede almacenar de forma permanente en el dispositivo o lector, o de forma transitoria. Este puede ser importado en el dispositivo o lector desde un dispositivo externo.

El dispositivo de ensayo puede comprender un receptor de muestras poroso en conexión para circulación de fluidos con una vía de flujo y anterior a la misma. El dispositivo de ensayo puede comprender más de una vía de flujo de ensayo, cada una de las cuales comprenda una zona de detección, en cuyo caso se puede disponer un único

receptor de muestras poroso que sea común a las múltiples vías de flujo de ensayo. De esta manera, una muestra líquida aplicada en el receptor de muestras poroso 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 de un 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 manera que el elemento tiene una estructura amorfa similar a una esponja). Se pueden usar materiales plásticos porosos, tales 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, se puede disponer un «sumidero» absorbente en el extremo distal del material de soporte. El sumidero absorbente se puede componer, 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 extienda 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 se puede tratar para bloquear todos los sitios de unión restantes. El bloqueo se puede conseguir, por ejemplo, por tratamiento con una proteína (por ejemplo, albúmina de suero bovino o proteína láctea) o con alcohol polivinílico o etanolamina, 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 se puede depositar, por ejemplo, como una disolución acuosa en la región en la que se ha de aplicar el reactivo de unión marcado. Tales materiales se podrían aplicar en el soporte poroso como una primera aplicación, seguida de la aplicación del marcador, de manera alternativa, tales materiales se podrían mezclar con el marcador y aplicarse en el soporte poroso o combinaciones de ambos. Tal material se puede depositar delante del reactivo de unión marcado o en este.

De manera alternativa, 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 micrómetros, por ejemplo, mayor que aproximadamente 5 micrómetros y, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y 12 micrómetros.

El soporte poroso de nitrocelulosa puede estar reforzado en la parte posterior, por ejemplo, con una lámina de plástico, para aumentar su resistencia a la manipulación. Este refuerzo se puede fabricar fácilmente formando una capa fina de nitrocelulosa sobre una lámina del material de refuerzo, tal como Mylar™.

Los reactivos de unión secos se pueden disponer 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 se puede pretratar con un agente tensioactivo o un disolvente, si es necesario, para hacerlo más hidrófilo y para estimular una rápida absorción de la muestra líquida. Entre los materiales adecuados para un soporte macroporoso se 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 se puede disponer 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.

El soporte poroso puede 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 típicamente un alojamiento que contiene el ensayo o los ensayos. El alojamiento puede ser impermeable a los líquidos y estar construido de un material plástico adecuado, tal 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.

5 El alojamiento puede estar construido de un material impermeable a los líquidos. Es deseable 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, lo más preferentemente, 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, Polystyrol, polietileno de alta densidad o polipropileno con un pigmento fotobloqueante apropiado. En el exterior del alojamiento se puede incluir una abertura que comunique con el ensayo localizado en el espacio interior dentro del alojamiento. De manera alternativa, la abertura puede servir para permitir la extensión de un receptor de muestras poroso desde el alojamiento hasta una posición externa al alojamiento.

15 Un dispositivo de ensayo que comprenda dos o más ensayos puede tener una zona de referencia compartida, en la que el valor de la señal obtenida en la zona de referencia para un ensayo se utiliza para compensar el valor de la señal obtenida en la zona de detección para el otro ensayo. Como tal, la zona de referencia es «compartida» entre ambos ensayos.

20 Un dispositivo de ensayo que comprenda dos o más ensayos puede tener una zona de control compartida, en la que la medición de la señal en la zona de control de un ensayo proporciona un valor o indicación de que la prueba se ha realizado correctamente (o incorrectamente) para ese ensayo, así como para el otro ensayo. Si, por ejemplo, la zona de control indica que la prueba se ha llevado a cabo correctamente para un ensayo, el dispositivo de ensayo toma la decisión de que la prueba se ha llevado a cabo correctamente en el otro ensayo. Por lo tanto, se puede considerar que la zona de control es «compartida» entre los ensayos del dispositivo de ensayo.

25 El dispositivo de ensayo puede comprender una zona de control compartida y una zona de referencia compartida.

30 El dispositivo de ensayo puede comprender además uno o más parámetros de desbordamiento de la medición, 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.

35 El dispositivo de ensayo puede comprender por ejemplo dos o más vías de flujo cada una de las cuales comprende una zona de detección para la detección de la hCG.

40 Existen muchas maneras diferentes de desarrollar un dispositivo de ensayo capaz de medir el analito hCG en un amplio intervalo. El dispositivo de ensayo se puede presentar en forma de, por ejemplo, un ensayo de «escalera» o de «rebose», en el que cualquier reactivo de unión marcado que no esté inmovilizado en la primera zona de detección pasa a una segunda zona de detección posterior. Las zonas de detección respectivas pueden comprender reactivos de unión inmovilizados que tengan diferentes afinidades de unión por un complejo reactivo de unión marcado-analito.

45 El dispositivo de ensayo puede comprender un primer ensayo de alta sensibilidad capaz de medir la hCG en un intervalo de analito inferior y un ensayo de baja sensibilidad capaz de medir la hCG en un intervalo de analito superior.

50 Con el fin de medir la hCG en un intervalo de analito superior, el dispositivo de ensayo puede comprender, por ejemplo, un reactivo de unión marcado para el analito y un segundo reactivo de unión para el analito, dispuesto delante de la zona de detección. El segundo reactivo de unión sirve para eliminar el exceso de analito y reducir la sensibilidad del ensayo. Esto tiene el efecto de aumentar el intervalo dinámico del ensayo, lo que permite realizar mediciones a mayores niveles del analito. El segundo reactivo de unión se puede proporcionar inmovilizado, movilizable o ambos. El segundo reactivo de unión se puede disponer en la misma región del soporte poroso que el reactivo de unión movilizable, anterior a este o posterior a este. El segundo reactivo de unión se puede unir 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 reactivo puede tener una afinidad diferente por el analito que el reactivo de unión marcado movilizable del segundo ensayo. En una realización de ejemplo, el segundo reactivo de unión tiene mayor afinidad por el analito que el reactivo de unión movilizable del segundo ensayo. La cantidad de segundo reactivo de unión se puede variar para cambiar la sensibilidad del ensayo para adecuarse a la concentración del analito. El aumento de la cantidad de segundo reactivo de unión presente reduce la sensibilidad del ensayo debido a que el segundo reactivo de unión 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.

65 Con el fin de aumentar el intervalo dinámico del ensayo, el dispositivo de ensayo puede comprender, por ejemplo, múltiples zonas de detección, en donde cada zona de detección es capaz de unirse al analito a diferentes niveles de concentración del analito. Por ejemplo las zonas respectivas pueden comprender reactivo de unión para el analito

que tengan diferentes afinidades por el analito.

Otras formas de aumentar el intervalo dinámico del ensayo consisten en proporcionar un dispositivo de ensayo que comprenda un ensayo de unión de tipo sándwich y un ensayo de competición o de inhibición. Por ejemplo, el ensayo de tipo 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. Otra forma es alterar la afinidad o la cantidad del reactivo de unión marcado o del reactivo inmovilizado en la zona de detección. 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. La sensibilidad del ensayo se puede cambiar mediante alteración de la relación entre el reactivo de unión y el marcador del reactivo de unión marcado. Si se usa una partícula como marcador, se puede alterar la cantidad del reactivo de unión que se añade al marcador para alterar la sensibilidad del ensayo. 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 se puede disminuir reduciendo la relación entre el reactivo de unión y la especie marcada para el reactivo de unión marcado.

Otra manera de manipular la sensibilidad de un ensayo es alterar la densidad óptica del marcador. La sensibilidad del ensayo se puede reducir con el uso de un marcador con una baja densidad óptica. Esto se puede conseguir, 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.

Otra manera más de medir altos niveles de analito es emplear un reactivo de unión marcado con un marcador no particulado. Unos niveles altos del analito cuando se miden por medio de un ensayo de unión de tipo sándwich pueden requerir altos niveles del reactivo de unión. En el caso en el que el marcador sea 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 tenga como resultado una escasa sensibilidad del ensayo. A la inversa, a niveles de analito inferiores, el uso de un reactivo de unión marcado con un marcador no particulado puede dar lugar a una baja señal debido a la baja densidad óptica. Sin embargo, a altos niveles de analito, los marcadores no particulados pueden detectarse fácilmente. Un ejemplo de un marcador no particulado ópticamente detectable puede ser un colorante. El colorante puede ser fluorescente.

La sensibilidad del ensayo puede estar afectada por el caudal del soporte poroso. Una manera de reducir la sensibilidad del ensayo es emplear un soporte poroso (tal como nitrocelulosa) con un mayor caudal.

La sensibilidad de un ensayo se puede manipular 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 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 tales como metilcelulosa dentro del dispositivo.

Durante el curso de sus investigaciones sobre la medición de la hCG en un amplio intervalo de analito, los inventores construyeron una serie de dispositivos diferentes, incluidos varios de acuerdo con la técnica anterior. Los investigadores encontraron que mientras que varios de tales dispositivos resultaron ser satisfactorios para la medición de analitos, adolecían de limitaciones en su capacidad de medir los niveles de los analitos en un amplio intervalo de analito con una exactitud suficiente como para satisfacer los requisitos reglamentarios necesarios para hacer que el dispositivo resulte adecuado para fines comerciales. 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.

De acuerdo con una realización, el dispositivo de ensayo comprende un primer ensayo y un segundo ensayo, en donde el primer ensayo para la determinación del analito hCG comprende una primera vía de flujo que tiene una única zona de detección capaz de inmovilizar un reactivo de unión dirigido contra hCG marcado y el segundo ensayo para dicho analito comprende una segunda vía de flujo que tiene una única zona de detección capaz de inmovilizar un reactivo de unión dirigido contra hCG marcado, en donde la presencia del reactivo de unión marcado en las zonas de detección proporciona una indicación de la presencia y/o el nivel del analito hCG en dicha muestra líquida.

El primer ensayo proporciona una indicación del nivel del analito hCG en un primer intervalo de concentraciones y el

segundo ensayo proporciona una indicación del nivel del analito hCG en un segundo intervalo de concentraciones más elevadas.

5 El primer y el segundo intervalos de concentraciones difieren entre sí. El primer y el segundo intervalos de concentraciones se pueden solapar para proporcionar un intervalo de concentraciones continuo.

El primer y el segundo ensayos pueden proporcionar, separada o conjuntamente, una indicación del nivel del analito hCG dentro de un cierto intervalo de concentraciones.

10 Como una alternativa a proporcionar el primer y el segundo ensayos en un único dispositivo de ensayo, los ensayos se pueden disponer 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.

La muestra líquida es orina.

15 El dispositivo de ensayo integral de la invención se puede usar para medir el nivel o la presencia de la hCG en un amplio intervalo de concentraciones. El intervalo puede variar entre aproximadamente 10 mUI y aproximadamente 250.000 mUI.

20 En una realización adicional, el dispositivo de ensayo integral comprende dos soportes porosos, cada uno de los cuales tiene una única zona de detección, comprendiendo el dispositivo una zona de referencia compartida y una zona de control compartida, en donde el dispositivo de ensayo comprende, además, un único fotodetector dispuesto para recibir luz procedente de las cuatro zonas y cuatro diodos emisores de luz.

25 En particular, el dispositivo de ensayo comprende dos ensayos, un ensayo de alta sensibilidad, es decir, el ensayo es sensible a niveles del analito a bajas concentraciones del mismo, y un ensayo de baja sensibilidad, es decir, el ensayo es sensible al analito a altas concentraciones del mismo.

30 En una realización particular, el dispositivo de ensayo comprende una primera vía de flujo de ensayo que comprende un reactivo de unión marcado movilizable para la hCG anterior a una zona de detección y una segunda vía de flujo de ensayo que comprende un reactivo de unión marcado movilizable para la hCG y un segundo reactivo de unión para la hCG anterior a una zona de detección. El segundo reactivo de unión marcado se puede disponer en la misma región o en las proximidades del reactivo de unión marcado. El segundo reactivo de unión se puede proporcionar inmovilizado o movilizable. En una forma de realización, el segundo reactivo de unión es movilizable. El
35 segundo reactivo de unión se puede unir 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. En particular, el segundo reactivo de unión es capaz de unirse a la subunidad beta de la hCG, y el reactivo de unión marcado movilizable es capaz de unirse a la subunidad alfa de la hCG. La cantidad de segundo reactivo de unión se puede alterar para cambiar la sensibilidad del ensayo.

40 De acuerdo con una realización, el dispositivo de ensayo comprende dos tiras de prueba del ensayo, cada una de las cuales tiene una zona de detección. En una tira de ensayo se dispone una zona de control compartida y en la otra tira de ensayo se dispone una zona de referencia compartida. El valor de la señal obtenida en la zona de referencia para un ensayo se utiliza para compensar el valor de la señal obtenida en la zona de detección para el
45 otro ensayo. Como tal, la zona de referencia es «compartida» entre ambos ensayos.

La incorporación de una zona de referencia y/o de control compartida reduce el número de componentes ópticos requeridos para el dispositivo de ensayo, ya que cada zona de referencia y/o de control requeriría una fuente de iluminación, tal como un LED.

50 Gracias al empleo de una zona de referencia y/o de control compartida, el dispositivo de ensayo puede reducir el número de zonas que han de ser detectada y, por consiguiente, el número de componentes ópticos que se han de emplear. El uso de zonas compartidas es más eficaz cuando las arquitecturas de ensayo del primer y del segundo ensayos son similares o, si se dispone la zona de referencia y/o de control en una o más vías de flujo auxiliares, cuando la arquitectura de ensayo de la una o más vías de flujo auxiliares es similar a la del primer y del segundo
55 ensayos. También es ventajoso el uso de la misma muestra líquida para cada ensayo. Esto se puede conseguir convenientemente proporcionando una región común de aplicación de muestras que esté en comunicación para circulación de fluidos con ambos ensayos. Así, una sola muestra líquida aplicada al dispositivo a través de la región común de aplicación de muestras puede fluir a través tanto del primer como del segundo ensayos. En los casos en
60 los que el primer y el segundo ensayos no sean idénticos, puede ser aceptable disponer una zona de referencia compartida, siempre y cuando los niveles de fondo de luz que se detectarían en cada ensayo sean suficientemente similares entre sí.

La zona de referencia compartida puede estar dispuesta como parte del primer o del segundo ensayo. De manera
65 alternativa, la zona de referencia puede estar dispuesta en una vía de flujo auxiliar al primer y al segundo ensayos. La zona de referencia se puede elegir a partir de una porción de la vía de flujo no correspondiente a una zona de

detección, o, en los casos en los que un reactivo marcado seco esté presente delante de la zona de detección, una parte que no corresponda al lugar en el que está presente el reactivo marcado seco.

En una realización, el dispositivo de ensayo comprende un primer ensayo de analito de alta sensibilidad que comprende una zona de referencia compartida y un segundo ensayo de analito de baja sensibilidad que comprende una zona de control compartida. El ensayo de baja sensibilidad puede comprender una mayor cantidad de reactivo de unión marcado que el ensayo de mayor sensibilidad. El ensayo de alta sensibilidad puede comprender una vía de flujo que comprende un reactivo de unión marcado para la hCG anterior a una zona de detección y el ensayo de baja sensibilidad puede comprender un reactivo de unión marcado para la hCG y un segundo reactivo de unión para la hCG anterior a una zona de detección.

La zona de referencia puede estar dispuesta después o antes de 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 se pueden corregir 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 también compensa las variaciones entre las muestras líquidas aplicadas en los dispositivos de ensayo, por ejemplo, las muestras de orina pueden variar ampliamente en color. El valor de la señal obtenida en la zona de referencia para un ensayo se utiliza para compensar el valor de la señal obtenida en la zona de detección para el otro ensayo. Como tal, la zona de referencia es «compartida» entre ambos ensayos. La incorporación de una zona de referencia compartida reduce el número de componentes ópticos requeridos para el dispositivo de ensayo, ya que cada zona de referencia requeriría una fuente de iluminación, tal como un LED.

El dispositivo de ensayo puede comprender más de dos ensayos, tales como tres, cuatro o cinco ensayos, en donde el dispositivo tenga una o más zonas de referencia compartida.

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

La figura 1 muestra la variación de los niveles hormonales y la temperatura basal corporal que se produce durante un ciclo menstrual típico de 28 días.

Las figuras 2 (a) y (b) muestran un dispositivo de ensayo de ejemplo de la invención.

La figura 3 muestra un dispositivo de ensayo de ejemplo de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 4 muestra un algoritmo de ejemplo para la determinación del caudal para un dispositivo de ensayo que comprende un ensayo de alta sensibilidad (HS) y un ensayo de baja sensibilidad (LS).

La figura 5 muestra un algoritmo de ejemplo para la determinación de un tiempo desde la concepción para un dispositivo de ensayo que comprende un ensayo de alta sensibilidad (HS) y un ensayo de baja sensibilidad (LS).

Las figuras 6 (a) - (c) muestran perfiles típicos de %A en función del tiempo de ensayo que se obtienen para un dispositivo de ensayo y método para la detección de la hCG.

La figura 7 muestra la gráfica trazada del tiempo desde la concepción en función del $\log(hCG+0.1)$ obtenida para una cohorte de mujeres y una curva exponencial ajustada de acuerdo con el ejemplo 2.

Las figuras 8 (a) y (b) muestran las relaciones ajustada y observada para los ensayos de alta y baja sensibilidad preparadas de acuerdo con el ejemplo 1.

Descripción detallada de las figuras

La figura 2a muestra un dispositivo de ensayo de ejemplo de la invención. El dispositivo es alargado, con una longitud de aproximadamente 14 cm y una anchura de aproximadamente 25 mm, y comprende el alojamiento (50), un receptor de muestras poroso (51) y una pantalla LCD (53) para la visualización de los resultados del ensayo. También se proporcionan dentro del ensayo, y no se muestran, las vías de flujo de ensayo, los medios ópticos, una fuente de alimentación y los componentes electrónicos asociados. El dispositivo de ensayo también puede tener una tapa desmontable (52) que se ajuste sobre el receptor de muestras poroso.

La figura 2b muestra un dispositivo de ensayo de ejemplo de acuerdo con la invención que se ha abierto para mostrar algunos de los componentes. El dispositivo comprende alojamientos superior e inferior (510, 512), un comprimido desecante (513) para mantener bajos niveles de humedad dentro del dispositivo, una batería (516), un deflector óptico (514) y un chip informático (515).

La figura 3 muestra la disposición de los soportes porosos individuales del ensayo de un dispositivo de ensayo de

acuerdo con una realización de ejemplo que tiene una zona de control y de referencia compartida. El dispositivo de ensayo (60) tiene una región común de aplicación de muestras (61) que conecta para circulación de fluidos el primer y el segundo ensayos (62) y (63). Las zonas (64) y (65) corresponden respectivamente a una zona de detección y de control para el ensayo. Las zonas (66) y (67) corresponden respectivamente a una zona de detección y una zona de referencia.

La figura 4 muestra un algoritmo de ejemplo para la determinación del caudal para un dispositivo de ensayo que comprende un ensayo de alta sensibilidad (HS) y un ensayo de baja sensibilidad (LS).

Una vez completada la calibración, todas las ventanas se miden y se filtran.

El tiempo de detección de flujo mínimo (Min FDT) se puede definir como el tiempo mínimo que tardará el flujo en llegar a una o más zonas de medición. Si se detecta flujo a tiempos menores que el tiempo de detección de flujo mínimo, se supone que el dispositivo ha «despertado» (se ha activado) tarde y que es probable que todos los valores de calibración se hayan visto afectados por flujo ya presente en la ventana durante la calibración. Estos dispositivos se pueden clasificar como «errores de activación tardía».

El tiempo de detección de flujo máximo (Max FDT) se puede definir como un tiempo en el cual la muestra líquida tiene que llegar a todas las zonas de medición después de haber sido aplicada al dispositivo o después de que el dispositivo se haya activado después de la aplicación de la muestra líquida. Si no se ha detectado flujo en la totalidad de las zonas de medición antes de este tiempo máximo desde la activación del dispositivo se supone que la muestra es insuficiente, es decir, no se ha aplicado una cantidad suficiente de muestra líquida al dispositivo de ensayo. Estos dispositivos se pueden clasificar como con muestra insuficiente.

El tiempo de tránsito de ventana mínimo (Min WTT) se puede definir como el tiempo mínimo en el cual el líquido pasa entre una zona y una zona posterior. El flujo entre las ventanas correspondientes a estas zonas debe ocurrir con una diferencia de tiempo mínima. Los tiempos de flujo menores que este tiempo pueden ser rechazados, ya que es probable que el dispositivo se haya inundado o tenga un exceso de muestra.

A continuación se presenta un ejemplo de los parámetros de caudal que se puede emplear:

Parámetro	Valor
Tiempo de detección de flujo mínimo (Min FDT)	3 segundos
Tiempo de detección de flujo máximo (Max FDT)	64 segundos
Tiempo de tránsito de ventana mínimo (Min WTT)	2 segundos

La figura 5 muestra un algoritmo de ejemplo para la determinación de un tiempo desde la concepción para un dispositivo de ensayo para la determinación de la hCG en un amplio intervalo de analito que comprende un ensayo de alta sensibilidad (HS) y un ensayo de baja sensibilidad (LS), cada uno de los cuales comprende una zona de prueba.

El cronometraje del ensayo tiene lugar desde el punto de detección del flujo hasta la ventana de la línea de prueba de alta sensibilidad. El algoritmo proporciona una indicación temprana de «embarazada», antes de que transcurra el tiempo completo de la prueba de ensayo. Las indicaciones del tiempo desde la concepción o «no embarazada» se dan una vez transcurrido el tiempo completo de la prueba de ensayo (tiempo completo de desarrollo del ensayo).

Una vez que se ha determinado que el flujo es válido según el parámetro del algoritmo de flujo, después del tiempo de desarrollo mínimo, si HS_t (%A) excede el umbral máximo de decisión temprana de embarazo y $Ctrl_t$ (%A) está por encima del umbral de la línea de control, entonces se presenta un resultado de EMBARAZADA.

Una vez transcurrido el tiempo de desarrollo mínimo y tras mostrarse EMBARAZADA, posteriormente si LS_t (%A) excede el umbral máx. de decisión temprana de embarazo, aparece la indicación de guía de concepción correspondiente al tiempo máximo (+3 semanas).

En el momento del tiempo completo de desarrollo del ensayo

Si transcurrido este tiempo ya se ha mostrado EMBARAZADA, entonces la línea de control no se prueba. De lo contrario, si la línea de control está por debajo del umbral de la línea de control, entonces se presenta el mensaje «Error del dispositivo» y la prueba finaliza.

Si HS_t (%A) excede el umbral medio de decisión de embarazo, se muestra la indicación de guía de concepción correspondiente al tiempo medio (2-3 semanas) y la prueba finaliza.

Si transcurrido este tiempo ya se ha mostrado EMBARAZADA, entonces se presenta la indicación de guía de

concepción correspondiente al tiempo mínimo (1-2 semanas) y la prueba finaliza. Si HS_t (%A) excede el umbral mínimo de decisión de embarazo (PDTmin), entonces se muestra EMBARAZADA y la indicación de guía de concepción correspondiente al tiempo mínimo y la prueba finaliza.

- 5 De lo contrario, se muestra NO EMBARAZADA y la prueba finaliza.

Un ejemplo de los parámetros particulares del algoritmo de decisión para un dispositivo de ensayo para la detección de la hCG que se puede emplear es el siguiente:

Parámetro	Valor
Umbral de línea de control (CLT)	30 %A
Tiempo de desarrollo mínimo (MDT)	60 segundos
Umbral de decisión temprana de embarazo (EPDT)	14 %A
Umbral máx. de decisión temprana de embarazo (EPDTmax)	45 %A
Tiempo completo de desarrollo del ensayo (FDT)	150 segundos
Umbral medio de decisión de embarazo (PDTmid)	25 %A
Umbral mín. de decisión de embarazo (PDTmin)	9 %A

- 10 En particular, los parámetros del algoritmo de decisión se pueden emplear en el dispositivo de ensayo de acuerdo con el ejemplo 1 para la detección de la hCG. En particular, los parámetros del algoritmo de decisión se pueden emplear en el dispositivo de ensayo que comprende una zona de referencia y de control compartida, según se ilustra en la figura 3.

- 15 Las figuras 6 (a) - (c) muestran un perfil de señal típico de %A en función del tiempo (s) obtenido realizando pruebas con dispositivos de ensayo de acuerdo con el ejemplo 2 que tienen una línea de control y de referencia compartida de acuerdo con la figura 3 para diferentes niveles de hCG en orina. Las figuras 6 (a) - (c) se refieren a dispositivos de ensayo en los que se realizaron pruebas con una solución tampón con un contenido, respectivamente, de 0, 100 y 2000 mUI de hCG.

A continuación, la invención se comprenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos no limitantes.

25 Ejemplo 1

Preparación de un dispositivo de ensayo que comprende un ensayo de baja sensibilidad y un ensayo de alta sensibilidad para la determinación de la hCG en un amplio intervalo de analito.

- 30 Se preparó el ensayo de alta sensibilidad para la determinación del analito hCG, que comprende un reactivo de unión marcado movilizable para la hCG sobre un soporte poroso de fibra de vidrio dispuesto delante de una zona de detección y una zona de control dispuesta sobre un soporte poroso de nitrocelulosa. La zona de detección comprendió un reactivo de unión inmovilizado para la hCG.

- 35 La zona de detección se preparó depositando una línea de anticuerpo dirigido contra β -hCG (clon propio 3468) a una concentración de 3 mg/ml en tampón PBSA, a una velocidad de 1 ml/cm 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 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 en una posición de 10 mm a lo largo de la longitud de la nitrocelulosa.

- 40 La zona de control se preparó aplicando anticuerpo de cabra dirigido contra conejo (Lampire), 2 mg/ml en tampón PBSA, a 1 μ l/cm sobre nitrocelulosa en la posición de 13 mm, 3 mm después de la zona de detección, utilizando una plataforma de dispensación Biodot XYZ3050.

- 45 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 AnalR 65 104766P) más cloruro de sodio 150 mM (BDH AnalR 10241AP) más Trizma base 50 mM (Sigma T1503) más 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 μ l/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 μ l/mm, y se dejó que empapara la membrana durante aproximadamente cinco minutos. Las bandas de NC se secaron entonces 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 para la hCG.

5 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

- 10 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).
- 15 2. Lavar el látex diluido por centrifugación de un volumen de (2 ml) de látex diluido en dos tubos de centrífuga 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.
- 20 3. Preparar una mezcla de etanol y acetato de sodio (etanol BDH AnalaR 104766P al 95 % con acetato de sodio 25 Sigma S-2889 al 5 % p/v).
4. Añadir 100 μ l 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 ~1200 μ g/ml en DTB.
- 25 6. Calentar 1 ml del anticuerpo diluido de la etapa 5 en un baño de agua ajustado a 41,5 °C durante 2 minutos. Calentar también el látex lavado más etanol y acetato de sodio de la etapa 4 en el mismo baño de agua durante 2 minutos.
- 30 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/etanol-acetato e incubar en el baño de agua a 41,5 °C durante 30 minutos en agitación continua.
- 35 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 45 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).

45 El látex conjugado se pulverizó en una mezcla de BSA y sacarosa sobre un soporte poroso de fibra de vidrio (F52909, 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).

50 El reactivo de unión marcado para la zona de control también se depositó sobre la misma región del soporte poroso que el reactivo de unión marcado para el analito de la siguiente manera: Se conjugó IgG de conejo (Dako) con 400 nm de látex de poliestireno azul (Duke Scientific) en BSA/sacarosa para dar un % final de látex azul del 0,7 % en sólidos y se pulverizó a 65 g/h sobre fibra de vidrio.

55 El material de fibra de vidrio con el reactivo de unión marcado pulverizado se fijó a la membrana de nitrocelulosa mediante una película 55 laminada recubierta de un adhesivo transparente (Ferrisgate, 38 mm de ancho), dispuesta de tal modo que el reactivo marcado quedó en la parte superior y la fibra de vidrio se solapó con la superficie de la nitrocelulosa en ~2 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 de tal manera que quedó delante de la zona de detección.

60 La zona elegida como la zona de referencia estaba a una distancia de 13 mm a lo largo de la nitrocelulosa, es decir, después de la zona de detección.

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

65 Se preparó el ensayo de baja sensibilidad para la determinación de la hCG, que comprende un reactivo de unión marcado movilizable para la hCG y un segundo reactivo de unión movilizable para la hCG sobre un soporte poroso de fibra de vidrio dispuesto delante de una zona de detección y una zona de control dispuesta sobre un soporte poroso de nitrocelulosa. La zona de detección comprendió el reactivo de unión inmovilizado para la hCG.

La zona de detección se preparó de acuerdo a la del ensayo de alta sensibilidad.

- 5 La zona de control se preparó aplicando anticuerpo de cabra dirigido contra conejo (Lampire), 2 mg/ml en tampón PBSA, a 1 µl/cm sobre nitrocelulosa en la posición de 13 mm, 3 mm después de la zona de detección, utilizando una plataforma de dispensación Biodot XYZ3050.

Preparación del reactivo de unión marcado movilizable y del segundo reactivo de unión

- 10 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)
- 15 mediante el aparato BIODOT XYZS (número de serie 1673) a 90 g/h, pulverizada a 2,02 µg/cm sobre la fibra de vidrio F529-09.

- 20 El reactivo de unión marcado para la zona de control también se depositó sobre la misma región del soporte poroso que el reactivo de unión marcado para el analito de la siguiente manera: Se conjugó IgG de conejo (Dako) con 400 nm de látex de poliestireno azul (Duke Scientific) en BSA/sacarosa para dar un % final de látex azul del 0,7 % en sólidos y se pulverizó a 65 g/h sobre fibra de vidrio.

- 25 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). Posteriormente, 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).

- 30 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 transparente (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 ~2 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 de tal manera que quedó delante de la zona de detección.

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

- 40 Un receptor de muestras poroso común (505521, Filtrona Fibertech) de 43 mm de longitud, 12 mm de anchura y un grosor de aproximadamente 2,5 mm se colocó antes del primer y el segundo ensayos, y solapándose con estos en aproximadamente 3 mm.

- Los ensayos de alta y de baja sensibilidad se alojaron en un alojamiento de ensayo con el receptor de muestras poroso extendiéndose parcialmente desde el alojamiento.

- 45 Las señales se midieron desde las zonas de detección y la zona de control respectivas y se midieron con respecto a la señal medida desde la zona de referencia compartida.

Como alternativa a incorporar zonas de control y de referencia compartidas, cada uno de los ensayos de alta y de baja sensibilidad pueden comprender una zona de referencia y/o de control.

Ejemplo 2

Determinación de los valores de umbral que se han de almacenar en un dispositivo de ensayo o lector con el fin de determinar una fecha desde la concepción.

- 55 Se inscribió en un estudio a un grupo de mujeres con edades comprendidas entre 18 y 45, y fueron seleccionadas sobre la base de que tenían ciclos menstruales regulares entre 21 y 42 días durante los últimos 6 meses, no estaban amamantando, no tenían antecedentes conocidos de infertilidad, no sufrían el síndrome de ovarios poliquísticos, no padecían nefropatía ni hepatopatía crónicas y no habían usado anticonceptivos hormonales durante los últimos 3 meses, habiendo transcurrido al menos tres ciclos desde dejar de usarlos. Las mujeres proporcionaron muestras
- 60 diarias de orina durante un mínimo de seis ciclos y llevaron a cabo mediciones diarias de sus niveles de LH en orina utilizando un monitor Unipath FAM™ para controlar y registrar la fecha del aumento de la LH, además de llevar un diario para registrar el primer día de su último período menstrual. De las 61 mujeres que se quedaron embarazadas durante el estudio, se midieron sus niveles urinarios de hCG diariamente hasta 90 días después de la fecha de su aumento de la LH utilizando un analizador de laboratorio AutoDelphia de Perkin Elmer. Conociendo la fecha del
- 65 aumento de la LH de las mujeres embarazadas, se generó un conjunto de datos del nivel de hCG medido para cada mujer en particular como función de la fecha desde la concepción, en donde la fecha de la concepción se definió

como la fecha del aumento de la LH + 1 día.

Se utilizó una curva exponencial para modelar el $\log(hCG+0.1)$ en función del tiempo de embarazo, en la que:

5 $\log(hCG+0.1) = A + B \cdot Rx$

A (Máx)

B (Diferencia entre la ordenada en el origen y el máximo)

10

R (tasa de aumento)

x = tiempo de embarazo

15 Los datos sin procesar y la curva exponencial ajustada se muestran en la figura 7.

Se seleccionaron 31 muestras de orina de mujeres no embarazadas y se les añadieron distintas cantidades de hCG en concentraciones comprendidas entre 10 y 250.000 mUI/ml de hCG. Cada muestra enriquecida se aplicó a seis dispositivos de ensayo elegidos de tres lotes de acuerdo con el ejemplo 1. Los valores de la señal del analito (%A) correspondientes a los ensayos de alta y baja sensibilidad se midieron como función del nivel de hCG a un FDT de 150 s.

20

Se utilizó una curva logística de cuatro parámetros para modelar %A tanto para el ensayo de alta sensibilidad como para el ensayo de baja sensibilidad en función de las concentraciones $\log(hCG+0.1)$.

25

En la que:

$$\%A = A + \frac{C}{(1 + e^{-B(\log(hCG+0.1)-M)})}$$

30

y en la que:

B = pendiente

M = nivel de $\log(hCG+0.1)$ que tiene como resultado una respuesta a mitad de camino entre la respuesta mínima y la máxima

35

C = diferencia entre el máximo y el mínimo

A = mínimo

40

En las figuras 8 (a) y (b) se muestran las relaciones ajustada y observada para los ensayos de alta y baja sensibilidad.

Se diseñó un estudio de simulación para optimizar los umbrales PDTmin, PDTmid y EPDTmax con el fin de maximizar la clasificación de los embarazos en tres grupos, ≤ 2 semanas desde la concepción, 2-3 semanas desde la concepción y > 3 semanas desde la concepción, así como para cuantificar la precisión de la clasificación utilizando estos umbrales.

45

Los umbrales se evaluaron frente a los resultados de las muestras reales de cinco mujeres embarazadas con el fin de determinar su exactitud.

50

La simulación se llevó a cabo en tres etapas:

Etapas 1

55

Realizar la simulación en un amplio intervalo de umbrales. Los umbrales iniciales se eligieron aplicando los conocimientos previos sobre el dispositivo y los límites entre los grupos de acuerdo con lo predicho por el modelo exponencial a partir del primer conjunto de datos.

60

PDTmin (%) -5, 7,5, 10

PDTmid (%) -30, 32,5, 35

EPDTmax (%) -43, 45, 47

La elección de los 3 valores para cada umbral dio lugar a 27 combinaciones de umbrales que se debían simular.

Etapas 2

- 5 Elección de la mejor combinación de umbrales del paso 1 y analizar un intervalo más estrecho de umbrales alrededor de la mejor combinación.

Etapas 3

- 10 Elección de la mejor combinación de umbrales del paso 2 como conjunto óptimo y realizar una cuantificación más refinada.
- 15 En el método de simulación se utilizaron el modelo exponencial obtenido con el primer conjunto de datos y los dos modelos logísticos de cuatro parámetros obtenidos del estudio de la orina (FDT = 150 s) con el segundo conjunto de datos.
- 20 Se generaron 10.000 puntos de tiempo posteriores a la concepción a partir de una distribución uniforme para cada uno de los siguientes intervalos:
- 7 a 10 (7 a 9 días)
- 10 a 15 (10 a 14 días)
- 25 15 a 22 (2-3 semanas)
- 22 a 43 (3+ semanas (hasta 42 días));
- 30 en donde el tiempo es continuo y los límites son puntos de tiempo.
- Para cada punto de tiempo generado se simuló $\log(hCG+0.1)$. Para cada valor simulado de $\log(hCG+0.1)$ se calculó un valor correspondiente los valores más bajo y más alto de %A, y para cada par de valores de %A se calculó el resultado predicho de la guía de concepción utilizando un conjunto de umbrales.
- 35 En el paso 3 se realizó una simulación más refinada con 10.000 puntos de tiempo posteriores a la concepción generados a partir de una distribución uniforme para cada día desde el día 7 hasta el día 42. Cada intervalo de muestreo abarcó desde la medianoche hasta la medianoche siguiente, por ejemplo, los datos generados el día 7 eran números reales comprendidos entre 7 y 8.
- 40 Sobre la base del estudio, se calcularon los valores de umbral en %A para PDTmin, PDTmax y EPDTmax. Estos valores de umbral se pueden almacenar en un dispositivo de ensayo o lector con el fin de calcular un tiempo desde la concepción.

REIVINDICACIONES

1. Un lector de resultados de ensayo para su uso con un ensayo o dispositivo de ensayo adaptado para calcular una estimación cuantitativa del lapso de tiempo desde la concepción en un sujeto humano femenino, comprendiendo el lector de resultados de ensayo:
 - a) un primer umbral de analito almacenado correspondiente a 14 días desde la concepción,
 - b) un segundo umbral de analito almacenado correspondiente a 21 días desde la concepción,
 - c) un umbral mínimo de embarazo almacenado (PDTmin),
 - d) un medio de medición adaptado para medir un valor de la señal del analito correspondiente al nivel de hCG en una muestra de orina obtenida de dicho sujeto y comparar el valor de la señal del analito con el umbral mínimo de embarazo y con los primer y segundo umbrales de analito almacenados, ofreciendo de esta manera un estimación cuantitativa del lapso de tiempo desde la concepción sobre la base de la comparación,
 - e) un medio de visualización adaptado para mostrar un tiempo desde la concepción, el cual se define con relación a la fecha del aumento de la LH;en el que los resultados mostrados por el lector son los siguientes:

«no embarazada» si la señal del analito es menor que el umbral mínimo de embarazo;

1-2 semanas si la señal del analito es menor que el primer umbral de analito, pero mayor que el umbral mínimo de embarazo;

2-3 semanas si la señal del analito es mayor que o igual al primer umbral pero menor que o igual al segundo umbral; y

más de 3 semanas si la señal del analito es mayor que el segundo umbral.
2. Un dispositivo de ensayo adaptado para proporcionar una estimación cuantitativa del lapso de tiempo transcurrido desde la concepción en un sujeto mamífero hembra, comprendiendo el dispositivo de ensayo:
 - a) un lector de resultados de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1; y
 - b) uno o más ensayos para proporcionar un valor de la señal dependiente del nivel de hCG en una muestra de orina del sujeto.
3. Un método para determinar una estimación cuantitativa del lapso de tiempo desde la concepción en un sujeto mamífero hembra, consistiendo el método en:
 - a) aplicar una muestra de orina del sujeto que presuntamente contiene hCG a un ensayo o dispositivo de ensayo;
 - b) medir, por medio de dicho ensayo o dispositivo de ensayo, una señal de medición del analito, cuyo valor depende del nivel de hCG;
 - c) comparar el valor de la señal medida con un umbral mínimo de embarazo (PDTmin), en donde un valor de la señal del analito menor que el umbral mínimo de embarazo indica que la sujeto no está embarazada, y un valor de señal del analito por encima del umbral mínimo del embarazo indica la sujeto está embarazada;
 - d) comparar el valor de la señal medida con un primer umbral de analito que corresponde a 14 días desde la concepción;
 - e) comparar el valor de la señal medida con un segundo umbral de analito que corresponde a 21 días desde la concepción; y
 - f) proporcionar una estimación cuantitativa del lapso de tiempo desde la concepción basada en las comparaciones realizadas en las etapas (c), (d) y (e), de la siguiente manera:

1-2 semanas si la señal del analito es menor que el primer umbral de analito, pero mayor que el umbral mínimo de embarazo;

2-3 semanas si la señal del analito es mayor que o igual al primer umbral pero menor que o igual al segundo umbral; y

más de 3 semanas si la señal del analito es mayor que el segundo umbral; y en donde el tiempo desde la concepción se define con relación a la fecha del aumento de la LH.

- 5 4. El lector, dispositivo o método de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las respectivas reivindicaciones anteriores, en el que el primer umbral de analito y el segundo umbral de analito se pueden obtener a partir del análisis de un primer conjunto de datos que comprende los niveles urinarios de hCG medidos como una función del tiempo desde la concepción, y de un segundo conjunto de datos que comprende los niveles de señal medidos para dicho ensayo o dispositivo de ensayo como una función del nivel urinario de hCG.
- 10 5. El lector de ensayo o dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, que comprende además uno o más umbrales de analito almacenados adicionales correspondientes a uno o más tiempos desde la concepción.
- 15 6. El dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 o 5, que comprende una primera vía de flujo de ensayo que tiene una zona de detección para la medición de la hCG en un intervalo de concentración inferior y una segunda vía de flujo de ensayo que tiene una zona de detección para la medición de la hCG en un intervalo de concentración superior, comprendiendo el dispositivo un reactivo de unión marcado movilizable para la hCG anterior a la primera zona de detección del ensayo y un segundo reactivo de unión marcado
- 20 movilizable para la hCG y un reactivo de unión marcado para la hCG anterior a la segunda zona de detección del ensayo.
7. El dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que cada vía de flujo comprende, preferentemente, una sola zona de detección.
- 25 8. El dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, que comprende una zona de referencia compartida y/o una zona de control compartida.
9. El dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende un único fotodetector para detectar la luz de ambas zonas de detección, y cuatro fuentes luminosas para iluminar, respectivamente, una zona de
- 30 referencia compartida, una zona de control compartida y las dos zonas de detección.
10. El dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que la zona de referencia está situada a continuación de una zona de detección.
- 35 11. El dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que una o ambas vías de flujo de ensayo comprenden un soporte poroso de flujo lateral.
12. El dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho soporte poroso comprende
- 40 nitrocelulosa.

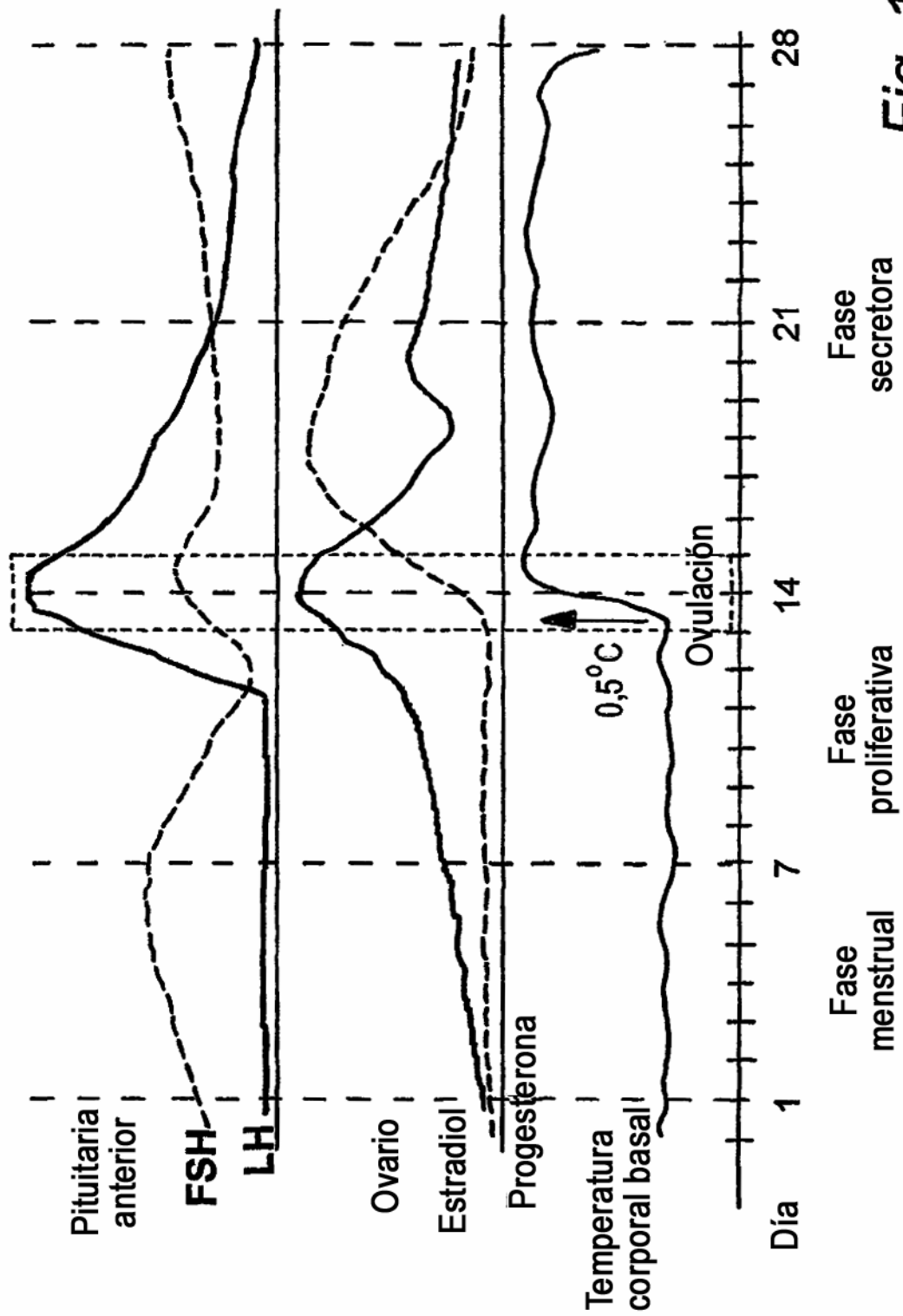


Fig. 1

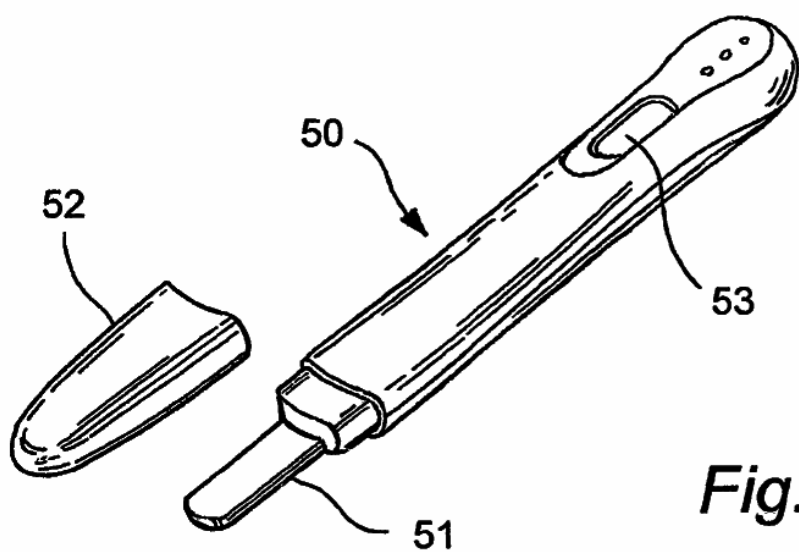


Fig. 2a

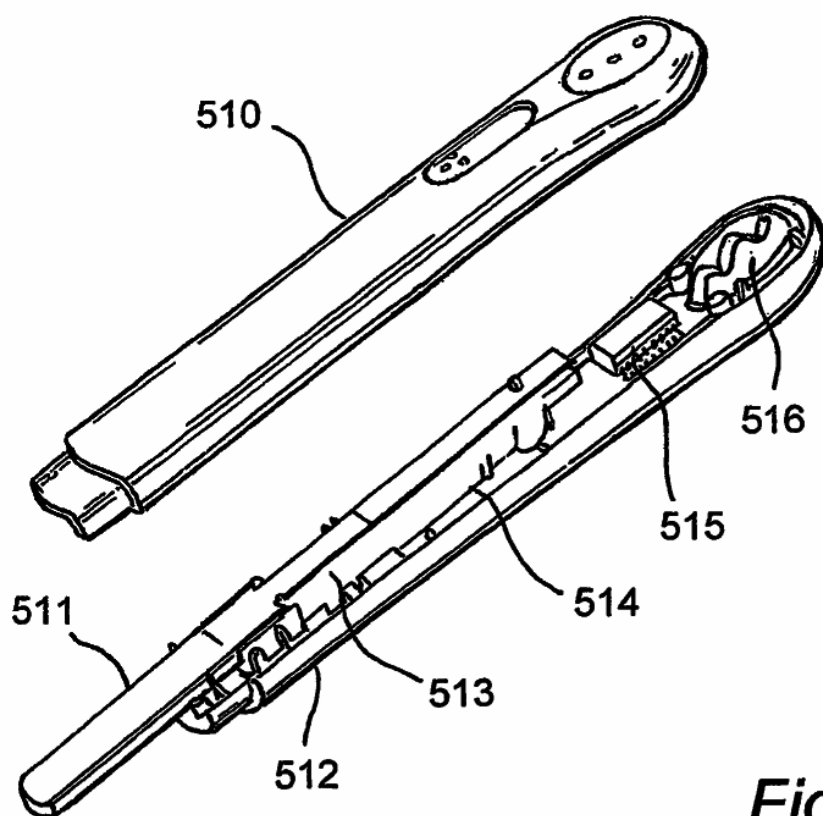


Fig. 2b

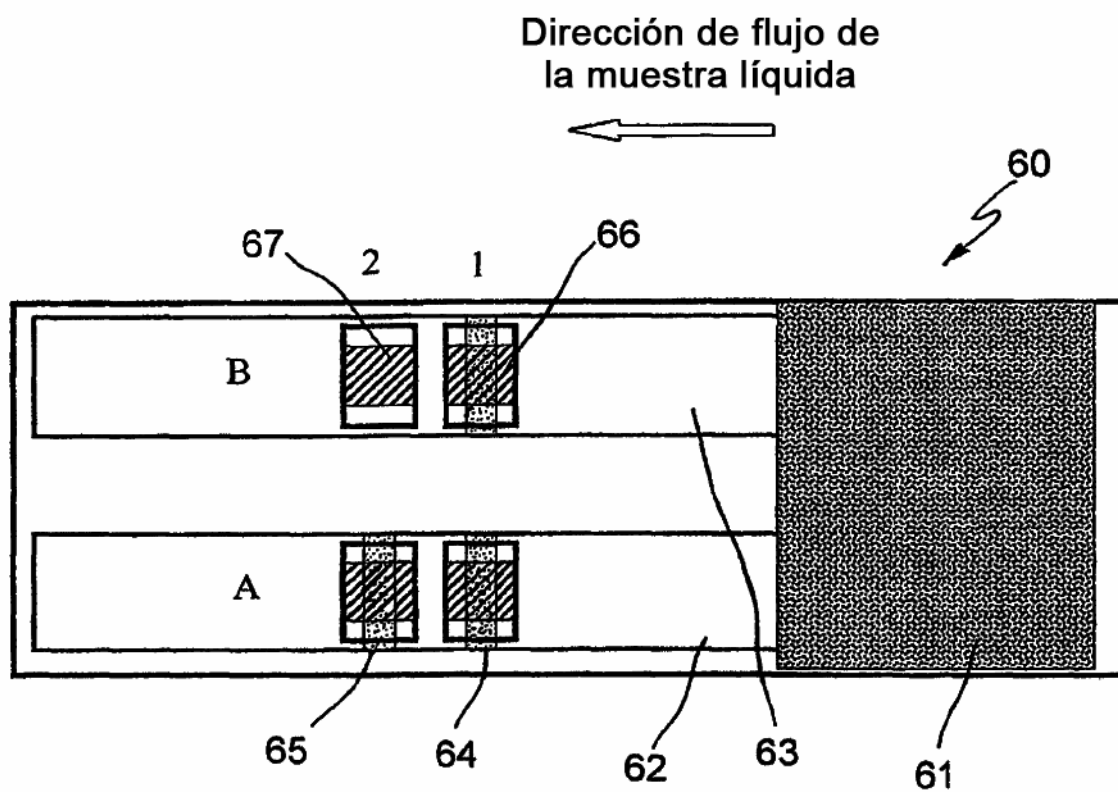
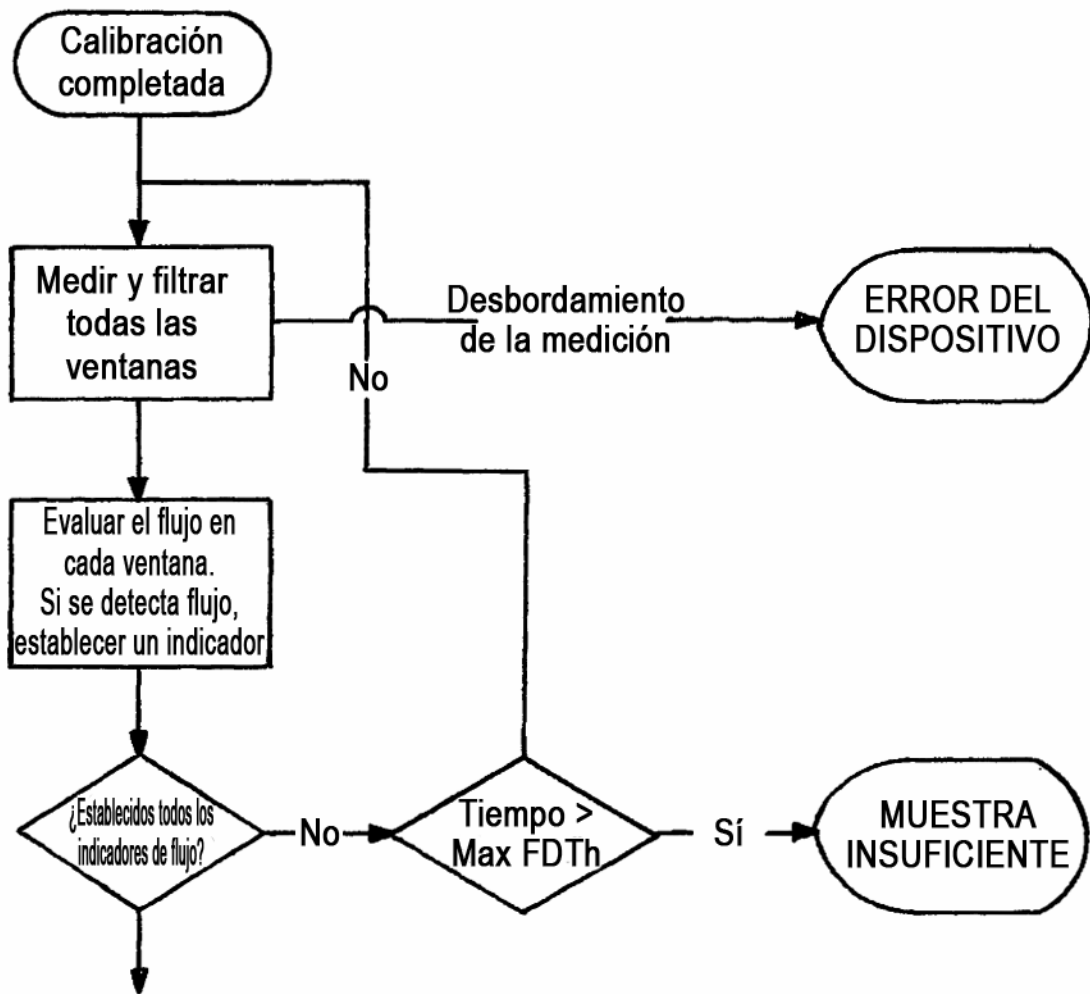


Fig. 3



A la Fig. 4
Hoja 2

Fig. 4
Hoja 1

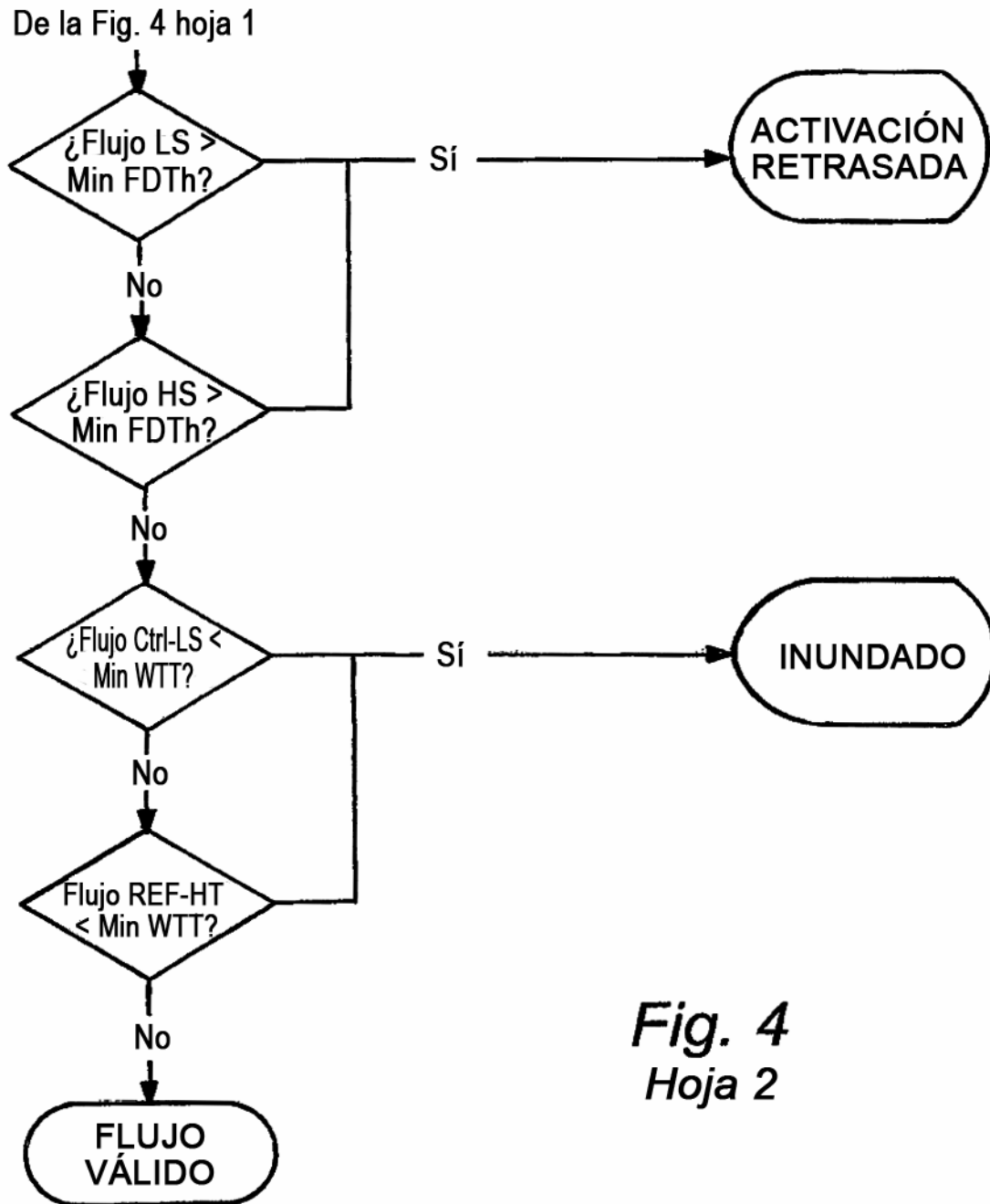
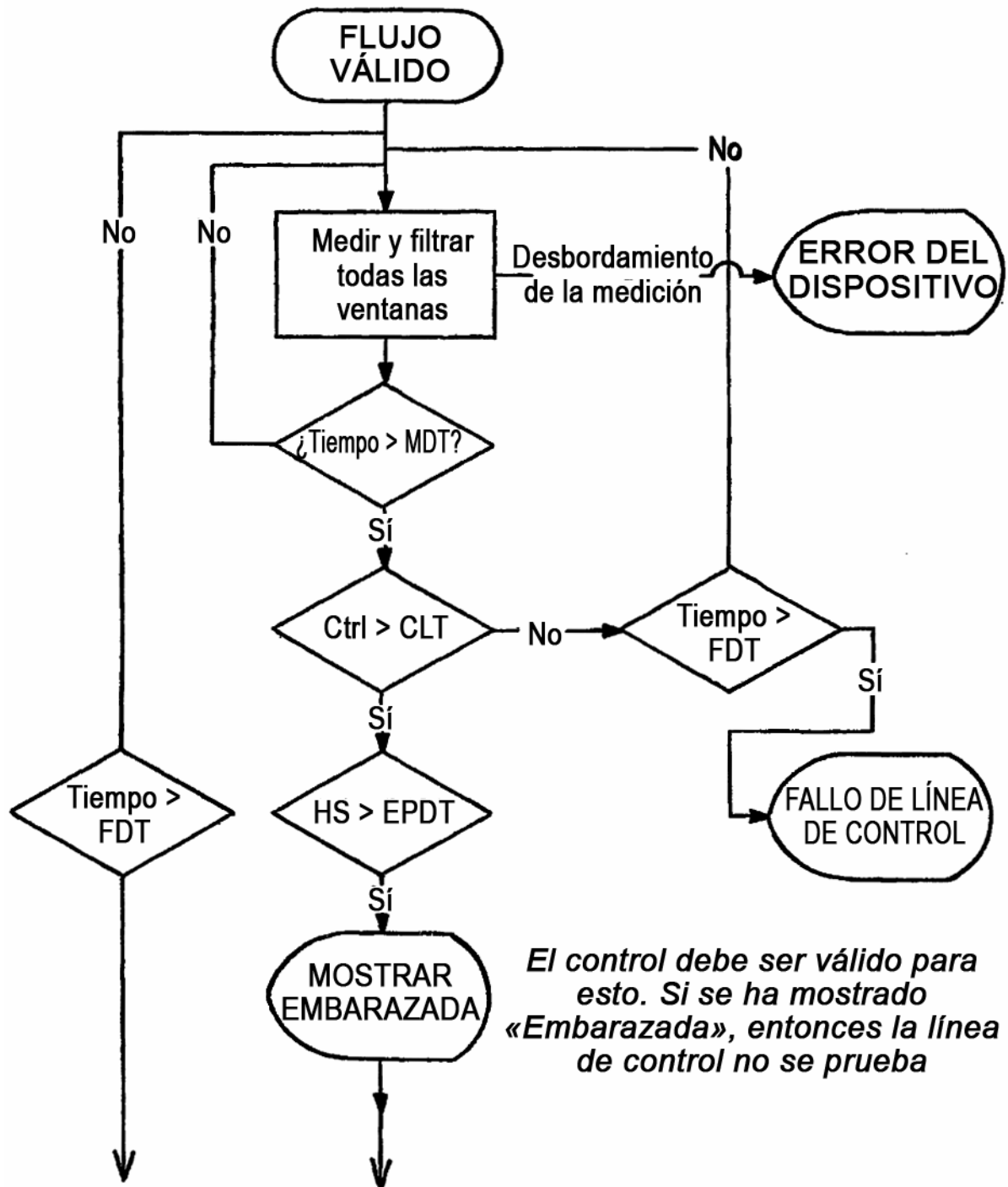
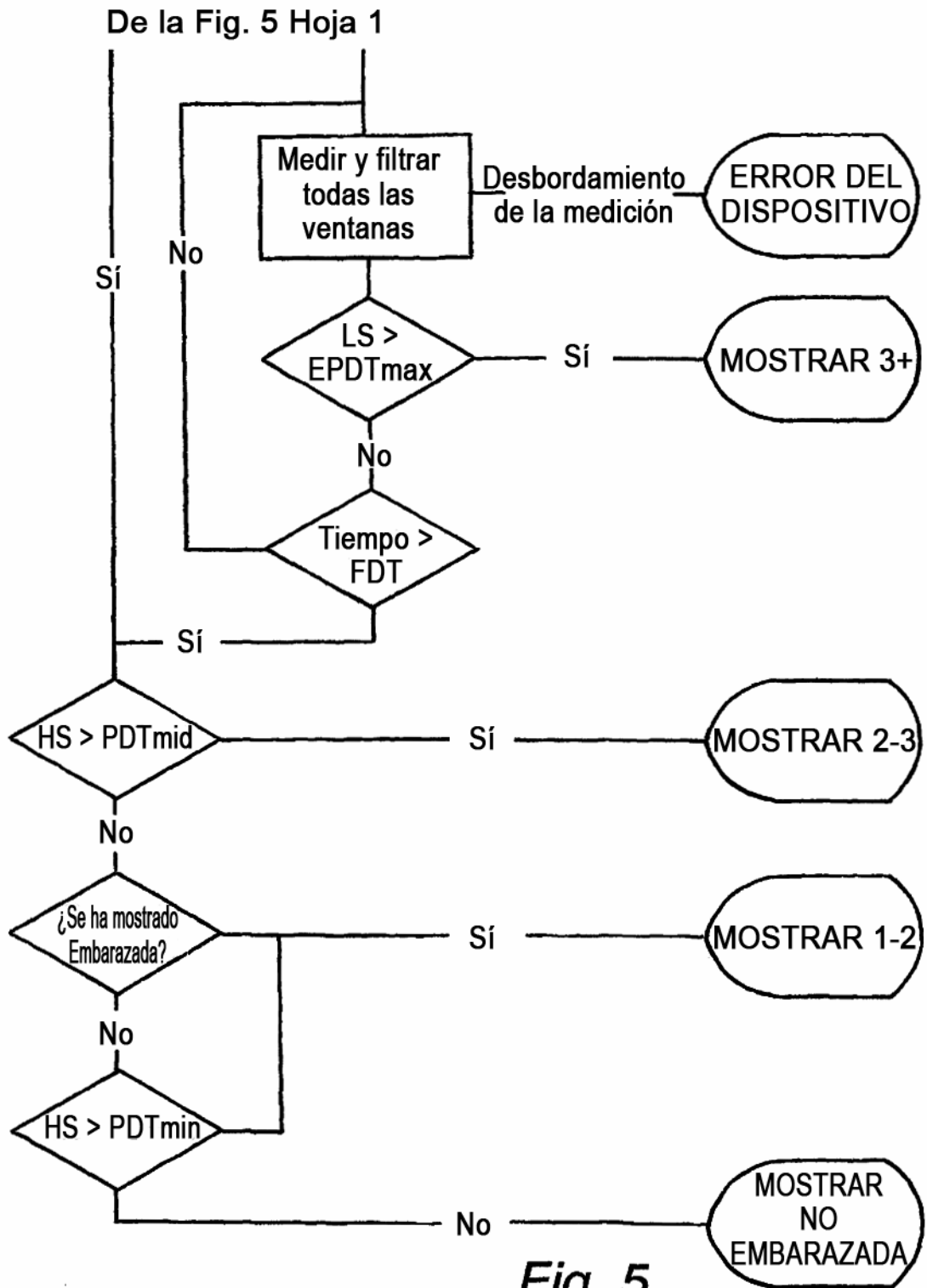


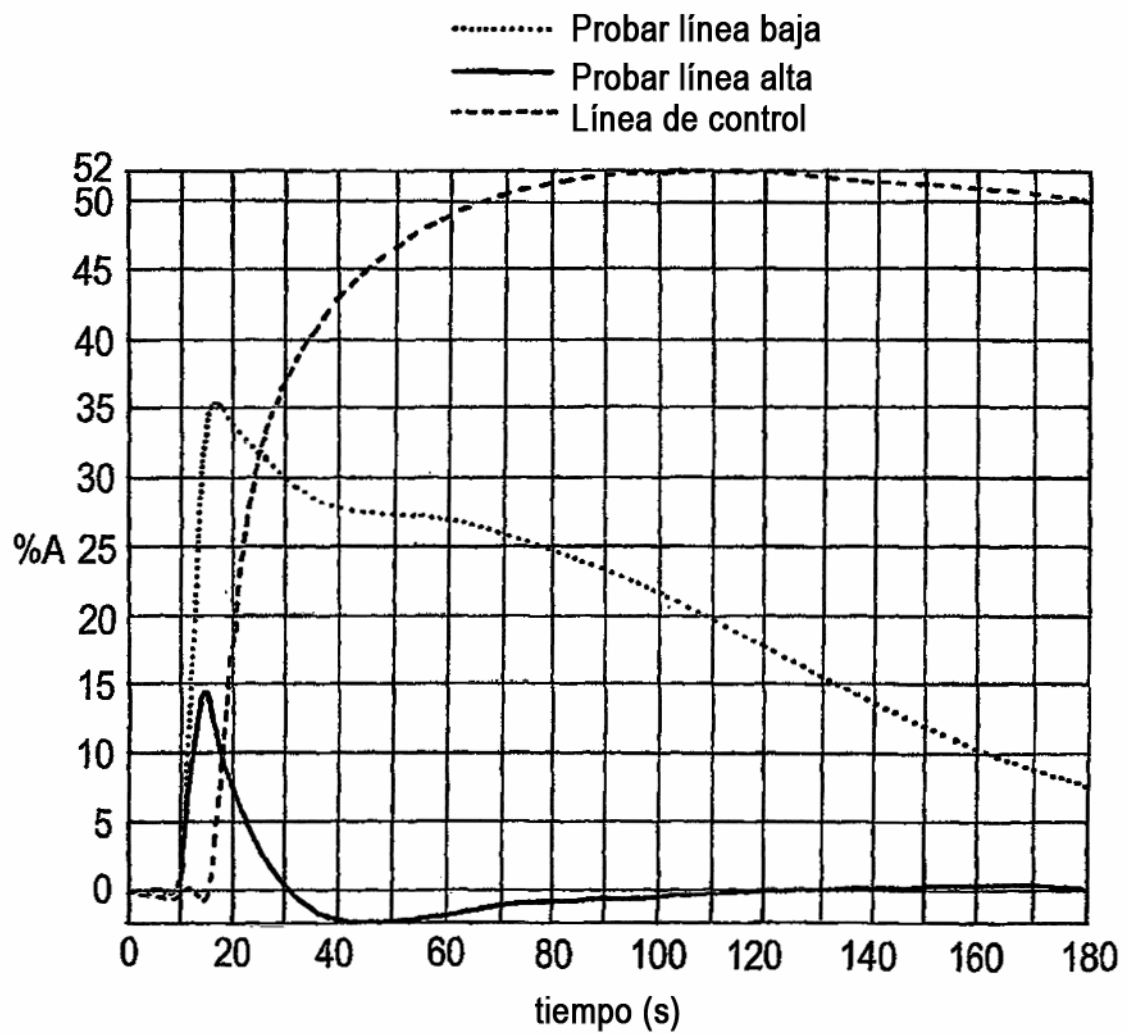
Fig. 4
Hoja 2



A la Fig. 5 Hoja 2

Fig. 5
Hoja 1



*Fig. 6(a)*

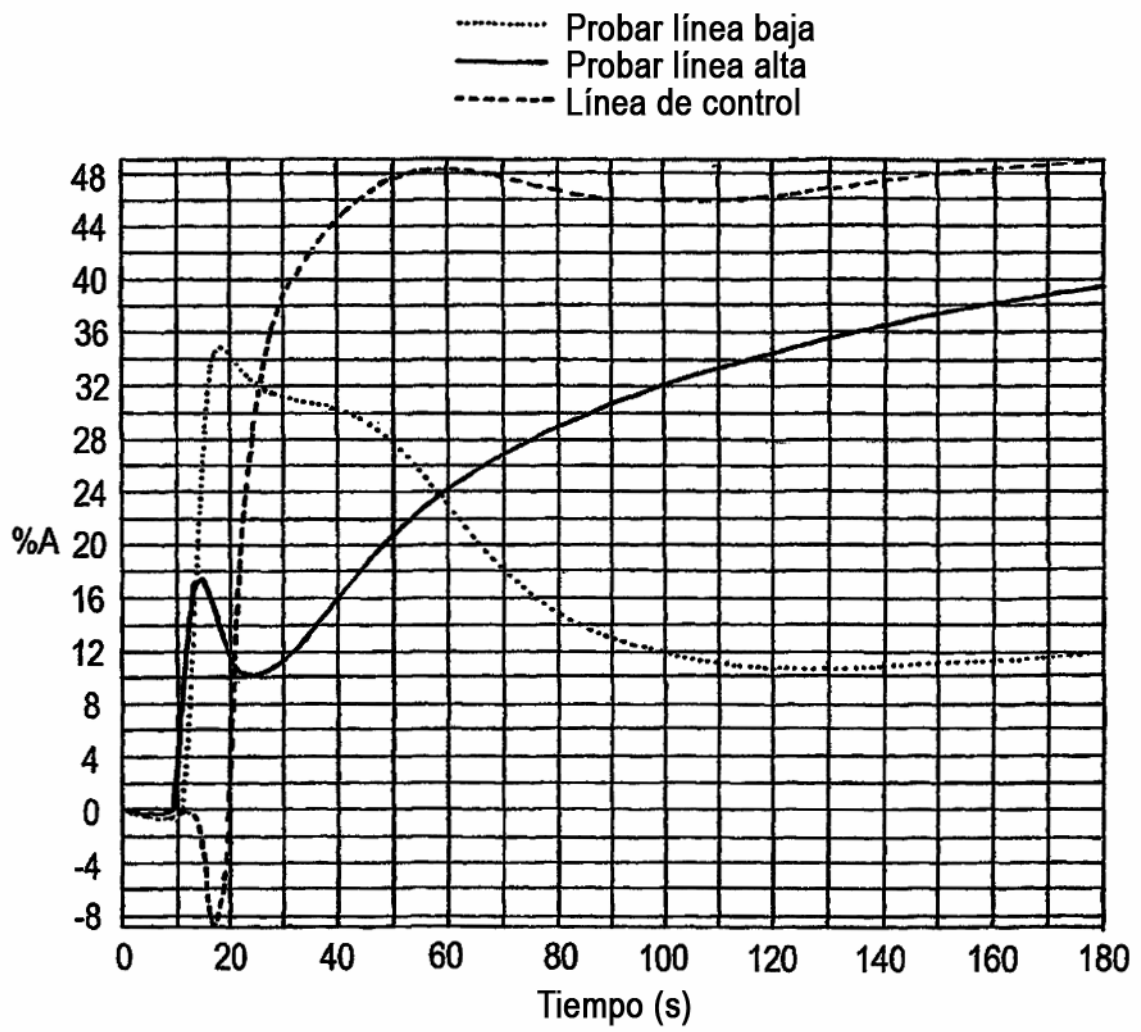


Fig. 6 (b)

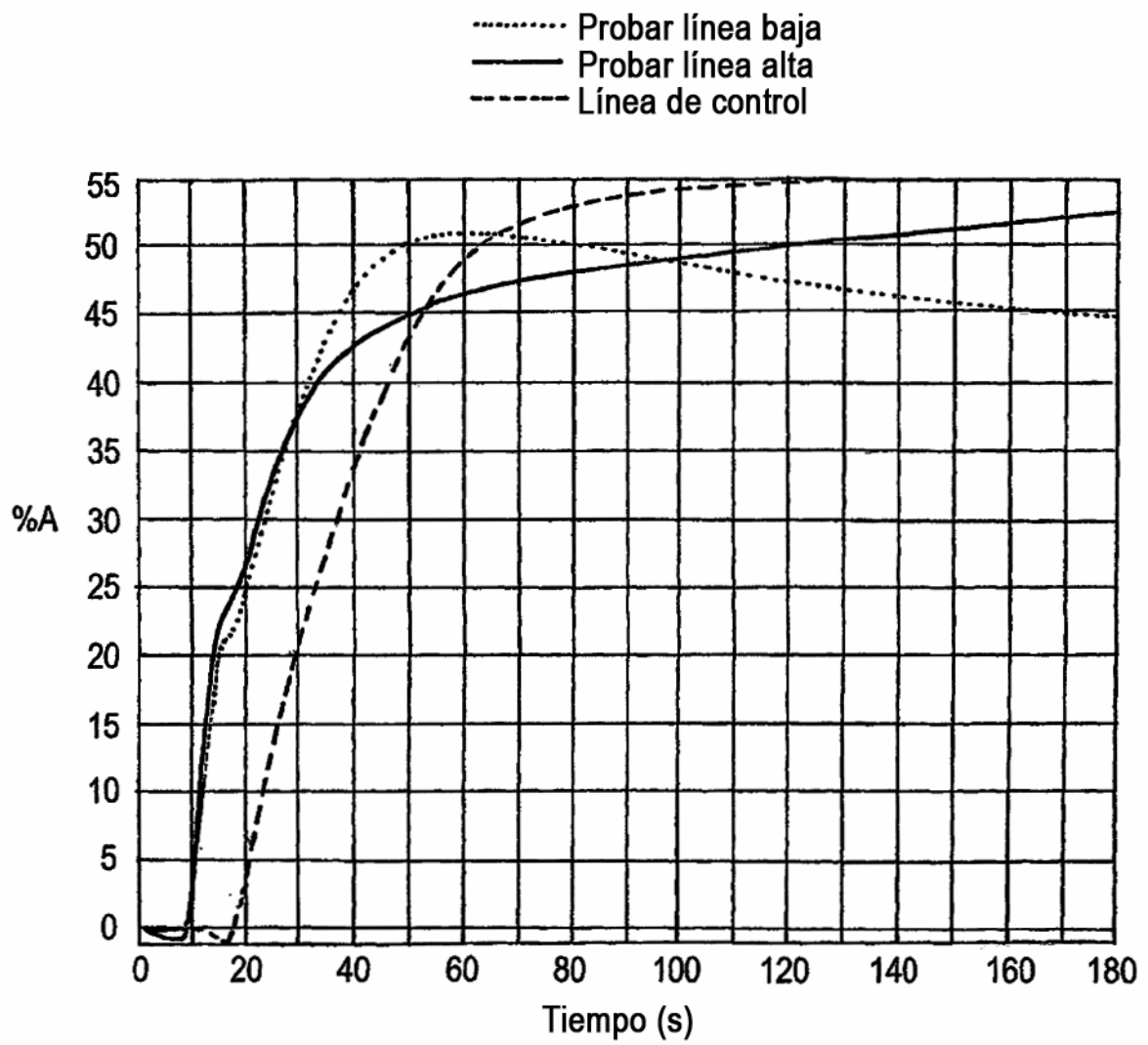


Fig. 6(c)

Datos sin procesar y curva exponencial ajustada del día del embarazo
en función del $\log(hCG+0.1)$

Relación ajustada y observada

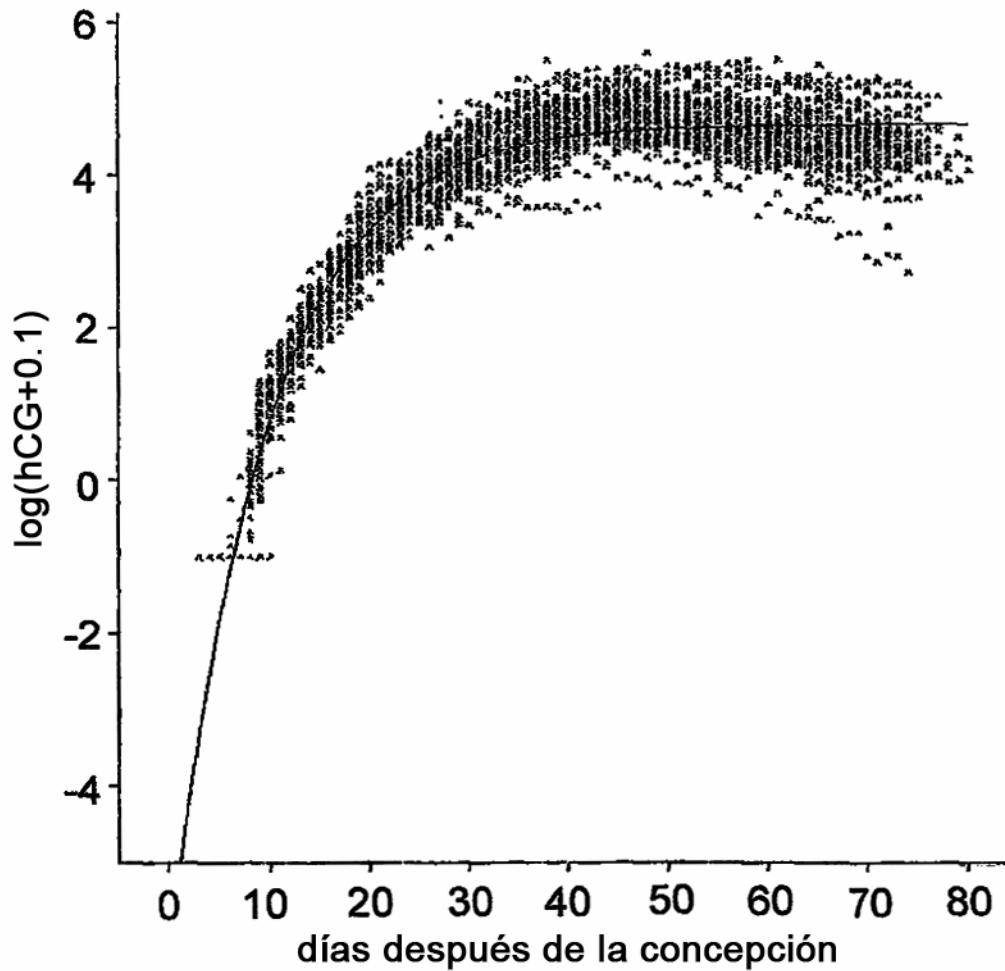


Fig. 7

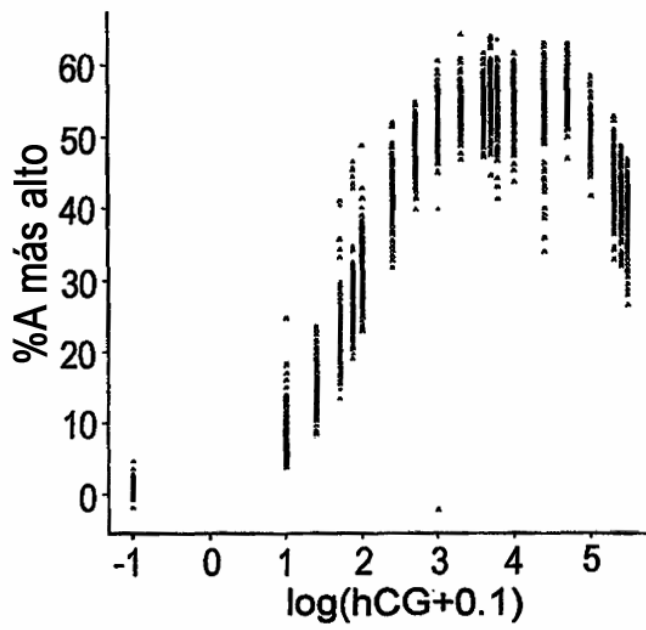


Fig. 8a

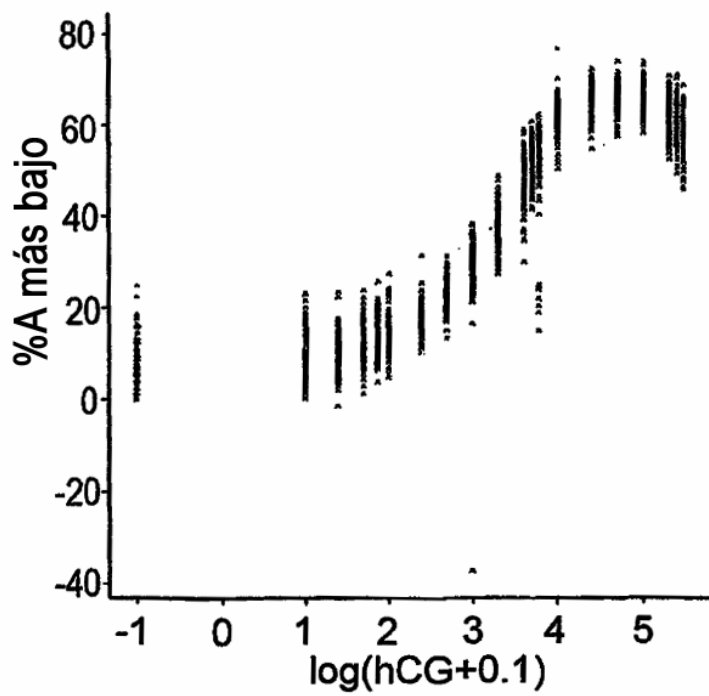


Fig. 8b