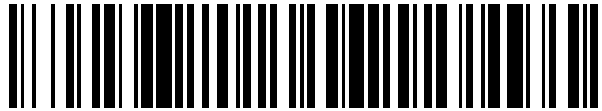


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 436**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011** **E 11728343 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2577317**

54 Título: **Procedimiento de detección de rotura de membranas fetales**

30 Prioridad:

**03.06.2010 FR 1054374**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.03.2015**

73 Titular/es:

**BIOSYNEX (SOCIÉTÉ À RESPONSABILITÉ  
LIMITÉE) (100.0%)  
12 Rue Ettore Bugatti  
67201 Eckbolsheim, FR**

72 Inventor/es:

**PAPER, THIERRY y  
RAKOTONDRAMANGA, FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 531 436 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**

Procedimiento de detección de rotura de membranas fetales

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de rotura de membranas fetales y al uso de un dispositivo de implementación de dicho procedimiento.

La presente invención encuentra una aplicación, en particular, en el campo médico, el campo del diagnóstico, en particular en el campo de la obstetricia.

En la siguiente descripción, las referencias entre corchetes ([ ]) se refieren a la lista de referencias presentadas al final del texto.

10 **Estado de la técnica**

Durante el embarazo, las mujeres pueden estar sometidas a diferentes factores y/o sucesos que podrían poner en peligro el embarazo. La rotura de membranas fetales forma parte de estos sucesos, en particular cuando la rotura de membranas es prematura.

15 El origen de esta rotura es variable. Puede tratarse, por ejemplo, de un traumatismo directo o indirecto, como un golpe a nivel abdominal, accidente de circulación, relaciones sexuales, etc. Puede deberse también a una fragilidad endógena de la membrana (deficiencia de colágeno, malnutrición, tabaquismo), un embarazo de gemelos, hidramnios, una complicación asociada con una amnioscopia, a la colocación de una laminaria durante una interrupción voluntaria del embarazo (IVE). También puede tener origen infeccioso y ser debida a una corioamnionitis, vulvovaginitis o endometritis. Finalmente, en el 60% de los casos la causa de la rotura es desconocida.

La rotura de membranas fetales conlleva un flujo del líquido amniótico y representa una “puerta abierta” a todos los agentes patógenos: bacterias, virus etc. Estos agentes pueden infectar, por ejemplo, el contenido uterino, el feto.

25 Además, la pérdida del líquido amniótico conlleva una disminución del espacio disponible para el desarrollo del feto. Cuando la rotura tiene lugar antes del plazo de 24 semanas de amenorrea, esta disminución puede poner en peligro el pronóstico vital del feto produciendo un aborto y/o conduciendo al nacimiento de un bebé no viable. Después de este plazo de 24 semanas, el pronóstico vital del niño todavía está en cuestión dando lugar a un parto prematuro y/o una infección del feto que puede conducir a la inducción voluntaria del parto. Además, la disminución del volumen del líquido amniótico puede provocar problemas de malformación, atrofia de las extremidades, anomalía del desarrollo de diferentes partes del cuerpo.

30 El diagnóstico de la rotura de membranas fetales es esencialmente clínico. Se trata de un examen con espéculo por el cual se ve un flujo del líquido amniótico. Esta prueba de diagnóstico es una prueba poco sensible, poco adaptada al diagnóstico de microrroturas y que no permite detectar rápida y fácilmente la rotura de membranas y que está asociado sobre todo a la capacidad del médico para poder identificar/ver el flujo del líquido.

35 Existen también otras pruebas, por ejemplo, la prueba de la nitrazina o la prueba de la diamina oxidasa, que permiten detectar una rotura de membranas fetales.

40 Sin embargo, estas pruebas no son fiables y pueden conllevar a la obtención de resultados falsos negativos (las pacientes para las que el resultado es un falso negativo presentan, por lo tanto, un embarazo de riesgo y no se las atiende y/o trata) y falsos positivos (las pacientes para las que el resultado es falso positivo no presentan embarazo de riesgo y pueden ser atendidas de la misma forma que una mujer con rotura, con el riesgo en particular de inducir un parto inútil). La prueba de la nitrazina, indicador de pH, está sometida a numerosas interferencias, en particular de la sangre, esperma, antisépticos o infecciones vaginales. La prueba de la diamina oxidasa recurre a técnicas de demostración basadas en radioinmunología y, por lo tanto, poco prácticas. Su sensibilidad varía de 84 a 91%. Su especificidad está limitada por la interferencia de la sangre.

45 También se han desarrollado y comercializado pruebas de diagnóstico basadas en la detección de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*inulin-like growth factor-binding proteina 1*: IGFBP1) por anticuerpos específicos en una muestra vaginal o de cuello uterino. Esta proteína está presente en el líquido amniótico en una concentración de 100 a 1000 veces superior a la del suero materno (Rutanen et al., “Radioimmunoassy of placental protein 12: levels in amniotic fluid, cord blood and serum of healthy adults, pregnant women and patients with trophoblastic disease”. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1982. [1]). Ejemplos de pruebas de la técnica anterior que usan este marcador son, por ejemplo, las pruebas inmunológicas descritas en la patente europea EP 0565541. Sin embargo, estas pruebas no son fiables puesto que pueden dar resultados falsos negativos que se deben, por ejemplo, a una concentración pequeña de IGFBP1 en el líquido amniótico, a un efecto gancho, a una degradación de la proteína en la vagina y/o in vitro, o a un efecto de la matriz. También pueden generar resultados falsos positivos que se deben, por ejemplo, a la presencia residual de IGFBP1 procedente de otros

medios biológicos distintos del líquido amniótico, en particular la sangre o las células deciduales del cuello uterino cuando está maduro.

5 También se han descrito pruebas de diagnóstico basadas en la detección de la alfa-fetoproteína (AFP) por anticuerpos específicos en una muestra vaginal o de cuello uterino. Un ejemplo de prueba de la técnica anterior que usa este marcador se describe en el artículo de Rochelson (Rochelson et al., "Rapid assay: possible application in the diagnosis of premature rupture of the membranes". *Obstet. Gynecol.* 1983; 62: 414-418 [2]).

Sin embargo, esta prueba no es fiable puesto que puede dar resultados falsos negativos y falsos positivos (sensibilidad de 93% y especificidad de 94% en mujeres con menos de 39 semanas de amenorrea).

10 Otro ejemplo de prueba de la técnica anterior la ha descrito Kishida (Kishida et al. "Diagnosis of premature rupture of the membranes in preterm patients, using an improved AFP kit : comparison with ROM-Check and/or nitrazine test". *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 69 (1996) 77-82) [12]. Para una población de pacientes cuyo término está comprendido entre 16 y 36 semanas, la sensibilidad y la especificidad en la muestra vaginal eran respectivamente 96,9% y 92,9%. En una muestra de cuello uterino, la sensibilidad y la especificidad eran respectivamente de 100% y 85,7%. Por lo tanto, y como otras pruebas del estado de la técnica, esta prueba no es fiable puesto que proporciona resultados falsos negativos y falsos positivos.

15 Se han descrito también otros marcadores de roturas menos eficaces, como la hormona coriogonadotropina humana (hCG) (Young-Han Kim et al., "Vaginal fluid b-human chorionic gonadotropin level in the diagnosis of premature rupture of membranes". *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005: 84: 802-805 [3]) o la prolactina (PRL) (Koninckx PR et al., "Prolactin concentration in vaginal fluid: a new method for diagnosing ruptured membranes". *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1981; 88:607-610 [4]).

20 El documento US 2006/0240495 describe la detección en una muestra vaginal de varios marcadores seleccionados de, entre otros, AFP, fibronectina fetal, IGFBP-1, prolactina y hormona lactogénica placentaria humana, para indicar el estado del entorno intraamniótico (rotura de membranas fetales, infección o inflamación intraamniótica, maduración pulmonar fetal). La combinación de la AFP y la IGFBP-1 para detectar una rotura de membranas fetales no se describe explícitamente.

25 Por lo tanto, existe una necesidad real de encontrar un procedimiento de detección de la rotura de las membranas fetales que corrija estos defectos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, en particular, un procedimiento con una mejor sensibilidad y/o una mejor especificidad, que permita reducir los costes y mejorar la detección de la rotura de membranas fetales.

### 30 Descripción de la invención

La presente invención tiene precisamente por objeto responder a estas necesidades e inconvenientes de la técnica anterior proporcionando un procedimiento de detección in vitro de rotura de membranas fetales.

35 En particular, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de detección in vitro de una rotura de membranas fetales, que comprende una etapa de búsqueda simultánea en una muestra vaginal o de cuello uterino, de la alfa-fetoproteína (AFP) y de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP-1), procedimiento en el que se detecta una rotura de membrana fetal cuando se detecta solo la IGFBP-1 o en combinación con la AFP, la ausencia de rotura se detecta cuando no se detecta ni la IGFBP-1 ni la AFP, y cuando solo se detecta la AFP el procedimiento comprende opcionalmente además una etapa de detección de la IGFBP-1 sola.

40 Según la invención, la detección de la IGFBP-1 se puede reemplazar por la detección de cualquier otra proteína que se ha descrito que es idéntica a la IGFBP-1, por ejemplo, alfa microglobulina-1 placentaria (*placental alpha microglobuline 1* (PAMG-1)), proteína placentaria 12 ("*placental protein 12*"), alfa globulina-1 endometrial asociada al embarazo ("*Pregnancy associated endometrial alpha globulin*" (alpha1 PEG)), proteína 14 endometrial ("*Endometrial Protein 14*" (EP14)) (Bell C. "Secretory endometrial and decidual proteins : studies and clinical significance of a maternally derived group of pregnancy associated serum proteins". *Human Reproduction*. Vol. 1 -3 129-143. 1986 [13]; Nazimova et al. "Blood Serum Content of PAMG-1 Protein Binding Insulin like Growth Factor 1 (Somatomedin C) in Patients with Diabetes Mellitus". *Bullet. Experim. Biol. and Med.* 166/9, septiembre de 1993 [14]).

45 Los autores de la invención son los primeros que han descubierto, en particular, que la detección de los dos marcadores es complementaria y permite alcanzar una tasa de sensibilidad más elevada. En particular, los autores de la invención son los primeros que han descubierto que la detección simultánea de los dos marcadores, que son la alfa-fetoproteína (AFP) y la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*insuline-like growth factor-binding protein 1*) (GFBP-1), permite aumentar ventajosamente la especificidad y la sensibilidad de la detección de la rotura.

50 Según la invención, por muestra vaginal o de cuello uterino se entiende, por ejemplo, una muestra tomada a nivel de la pared de la vagina de una mujer embarazada, o a nivel del fórnix posterior de la vagina, a nivel del cuello de secreciones vaginales o cervicovaginales.

Según la invención, la muestra se puede obtener por cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica. La muestra se puede obtener, por ejemplo, por pipeteo mediante una pipeta o por frotamiento de las paredes de la cavidad vaginal, por ejemplo, con un hisopo estéril cuya punta puede ser de algodón o de una fibra sintética. Puede ser, por ejemplo, de poliéster.

- 5 Según la invención, la búsqueda de la AFP y IGFBP-1 se puede realizar, por ejemplo, mediante anticuerpos. La detección de cada uno de los marcadores se puede realizar, por ejemplo, mediante anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y/o cualquier anticuerpo disponible en el comercio capaz de unirse específicamente a la AFP o la IGFBP-1.

- 10 Según la invención, los anticuerpos dirigidos contra la AFP (anticuerpos anti-AFP) pueden ser, por ejemplo, anticuerpos anti-AFP descritos en la solicitud internacional WO 2004013180, anticuerpos comercializados por la empresa Anticorps en Ligne (número de catálogo ABIN93624), anticuerpos comercializados por la empresa Arista Biologicals (clon 1, número de catálogo ABAFP-0401; clon 2, número de catálogo ABAFP-0402; clon 3, número de catálogo ABAFP-0403; clon 4, número de catálogo ABAFP-0404), anticuerpos comercializados por la empresa Hytest (clon 5H7, clon 4A3 y clon XA2, número de catálogo 4F16; anticuerpos policlonales, número de catálogo ABAFP-0501).

Según la invención, los anticuerpos dirigidos contra la AFP pueden estar marcados o no. El marcaje se expone más adelante. Los anticuerpos anti-AFP usados en la captura y los marcados, deben dirigirse contra epítomos diferentes, con el fin de que pueda funcionar el sistema de tipo sándwich.

- 20 Según la invención, la concentración del anticuerpo anti-AFP puede ser, por ejemplo, de 0,1 a 100 µg/ml o de 0,1 a 10 mg/ml.

Según la invención, el pH de la solución que comprende los anticuerpos anti-AFP puede ser de 5 a 10, preferiblemente de 6 a 9.

- 25 Según la invención, los anticuerpos dirigidos contra la IGFBP-1 (anticuerpos anti-IGFBP-1) se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que comprende los anticuerpos descritos en los documentos de Rutanen et al., *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152: 208 [5], y de Pekonen et al., *J Immunoassay* 1989; 10: 325-337 [6], anticuerpos anti-IGFBP-1 comercializados por la empresa Lenco Technologies (número de catálogo I-695, I-746 y I-805), anticuerpos anti-IGFBP-1 comercializados por la empresa SIGMA ALDRICH (número de catálogo I 2032, clon 33627.11), anticuerpos comercializados por la empresa AbD Serotech (número de catálogo 5345-4859X, clon 6302 (7B11); número de catálogo 5345-4809X, clon 7B10), anticuerpos comercializados por la empresa Hytest (número de catálogo 4I52; clon A8 y clon G2; número de catálogo 4IG8; clon G5F8 y clon C7B9), anticuerpos comercializados por la empresa Biospacific (número de catálogo A61403; número de catálogo A61400; número de catálogo A61402), anticuerpos comercializados por la empresa Santa Cruz (número de catálogo A61401136, A61400136 o A61403136).

- 35 Según la invención, los anticuerpos dirigidos contra la IGFBP-1 pueden estar marcados o no. El marcaje se expone más adelante. Ventajosamente, los anticuerpos anti-IGFBP-1 usados en la captura y los anticuerpos anti-IGFBP-1 marcados pueden estar dirigidos contra epítomos diferentes.

Según la invención, la concentración del anticuerpo anti-IGFBP-1 puede ser de 0,1 a 100 µg/ml o de 0,1 a 10 mg/ml.

Según la invención, el pH de la solución que comprende los anticuerpos anti-IGFBP-1 puede ser de 5 a 10, preferiblemente de 6 a 9.

- 40 Ventajosamente, según la invención, la concentración de cada anticuerpo y/o el pH de cada solución que comprende cada anticuerpo pueden permitir modular el umbral de detección de las proteínas AFP o IGFBP-1.

Según la invención, los anticuerpos dirigidos contra AFP o IGFBP-1 pueden estar ventajosamente en forma seca.

- 45 Según la invención, los anticuerpos dirigidos contra AFP o IGFBP-1 se pueden marcar por cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Puede ser, por ejemplo, una molécula química, por ejemplo un marcador fluorescente, por ejemplo rodamina o isotiocianato de fluoresceína (FITC), una enzima, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que se revela en presencia de un sustrato específico, por ejemplo la TMB (o 3,3',5,5'-tetrametilbencidina), 4-metil-umeliferil-fosfato, nanopartículas coloreadas, por ejemplo, partículas de látex o de poliestireno, partículas de oro coloidal, liposomas, partículas de carbono o de selenio, nanopartículas fluorescentes que contienen, por ejemplo, quelatos de lantánidos (por ejemplo, europio), nanopartículas magnéticas, moléculas radiactivas, por ejemplo yodo 125, yodo 133, itrio.

- 50 Según la invención, el marcaje puede ser diferente en función de la especificidad del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-IGFBP-1 se puede marcar con un marcador diferente de aquel del anticuerpo anti-AFP. Ventajosamente, la diferencia de marcaje permite detectar si en la muestra está presente solo la AFP, solo la IGFBP-1 y/o la AFP y la IGFBP-1, gracias a la diferencia de marcaje. Los diferentes marcajes permiten detectar de forma distinta la AFP y la IGFBP-1.

Según la invención, los anticuerpos se pueden fijar previamente sobre un soporte sólido. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra la AFP o IGFBP-1 se pueden fijar sobre una membrana, por ejemplo una membrana de nitrocelulosa, el fondo de una placa de multipocillos y/o cualquier superficie conocida por el experto en la técnica, que permita la fijación de al menos un anticuerpo.

- 5 Según la invención, la cantidad de anticuerpo dirigido contra la AFP o IGFBP-1 fijadas se puede adaptar ventajosamente en función del anticuerpo y de la proteína que se busca. Por ejemplo, cuando se busca la AFP, la cantidad de anticuerpo fijada puede ser de 0,1 a 100 µg/ml o de 0,1 a 10 mg/ml; cuando se busca la IGFBP-1, la cantidad de anticuerpo fijada puede ser de 0,1 a 100 µg/ml o de 0,1 a 10 mg/ml.

- 10 El control de la cantidad de anticuerpo fijada permite ventajosamente adaptar el umbral de detección de la AFP y/o IGFBP-1. En efecto, cuanto más importante es la cantidad fijada, menor es el umbral de detección.

En otros términos, según la invención, los anticuerpos se pueden fijar previamente sobre un soporte, por ejemplo, por depósito o por acoplamiento químico.

- 15 Cuando los anticuerpos se fijan por depósito, se pueden depositar por ejemplo por aspersión en una superficie común o distinta del anticuerpo anti-AFP y el anticuerpo anti-IGFBP-1 como se ha definido anteriormente, después secar, por ejemplo, por el procedimiento descrito por Beer et al., "Qualification of cellulose nitrate membranes for lateral-flow assays", *IVD technology*, enero de 2002. [7]

Cuando los anticuerpos se fijan por acoplamiento químico, se pueden fijar, por ejemplo, por el procedimiento descrito por Beer et al. "Qualification of cellulose nitrate membranes for lateral-flow assays", *IVD technology*, enero de 2002. [7]

- 20 Según la invención, el procedimiento de la invención puede comprender además una etapa preliminar de dilución de la muestra vaginal o de cuello de útero en una solución de dilución. La solución de dilución puede ser cualquier solución conocida por el experto en la técnica para diluir estas muestras. Puede ser, por ejemplo, una solución fisiológica, una solución tampón. Puede ser también, por ejemplo, una solución que comprende borato 50 mM (02102391, Biosolve), BSA al 1% (AP-4510-01, Seracare Life Sciences), triton X-100 al 0,05% (pH 9,3).

- 25 Según la invención, el pH de la solución de dilución puede ser de 5 a 10, preferiblemente de 6 a 9.

Según la invención, la fuerza iónica de la solución de dilución puede ser de 10 a 100 mM, preferiblemente de 50 a 200 mM.

Según la invención, el procedimiento puede comprender una etapa de revelado.

- 30 Según la invención, la etapa de revelado se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica. Puede ser, por ejemplo, por un procedimiento radioinmunológico (RIA), inmunoradiométrico (IRMA), enzoinmunológico (EIA), inmunofluorométrico (IFMA), inmunofluorométrico de tiempo resuelto, luminoinmunológico (LIA), inmunomagnético, o por inmunocromatografía o inmunofiltración gracias a partículas coloreadas (látex, poliestireno, oro coloidal). Algunos de estos procedimientos se pueden llevar a cabo como se describe en Anne Harwood Peruski et al. "Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents". *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, julio 2003, pág. 506-513. [8]

- 35 Según la invención, el revelado puede ser, por ejemplo, directo o indirecto.

Cuando el revelado es indirecto o por competición, se puede usar, por ejemplo, un anticuerpo marcado dirigido contra la IGFBP-1 o AFP como se ha descrito anteriormente.

- 40 Cuando el revelado es directo (sistema de tipo sándwich), se puede usar, por ejemplo, un anticuerpo de captura y un segundo anticuerpo marcado dirigido contra la IGFBP-1 y un anticuerpo de captura y un segundo anticuerpo marcado dirigido contra la AFP, como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado se dirigen contra epítomos diferente de manera que formen una pareja que se pueda usar en el sistema de tipo sándwich.

Preferiblemente, el revelado es directo.

- 45 Ventajosamente, la intensidad de la señal del marcador es función de la cantidad y/o concentración de la AFP y/o IGFBP-1 presente en la muestra.

Según el marcador usado, el revelado puede ser visual o realizado mediante un dispositivo.

- 50 Cuando el marcador es un marcador coloreado visible como se ha descrito anteriormente, el revelado ventajosamente es visual. Cuando el marcador es, por ejemplo, un marcador radiactivo como se ha descrito anteriormente, el revelado se realizará, por ejemplo, mediante un dispositivo de medición de la radiactividad, por ejemplo, un contador Geiger.

La presente invención permite ventajosamente, detectar la AFP en una muestra cuando su concentración es de 0,5 a 50 ng/ml, de 1 a 25 ng/ml, de 1 a 2 ng/ml.

5 La presente invención permite ventajosamente, detectar la AFP en una muestra cuando su concentración es, por ejemplo, superior o igual a una concentración comprendida entre 2,5 y 50 ng/ml, preferiblemente comprendida entre 5 y 25 ng/ml.

En la presente invención, la detección de la AFP se puede llevar a cabo en una muestra diluida como se ha definido anteriormente.

En la presente invención, la determinación del umbral de la AFP se puede hacer usando una preparación de AFP natural procedente de la empresa Hytest (Ref. 8F8).

10 La presente invención permite ventajosamente, detectar la IGFBP-1 en una muestra cuando su concentración es superior o igual a una concentración comprendida entre 5 y 50 ng/ml, preferiblemente comprendida entre 10 y 30 ng/ml.

15 La presente invención permite también ventajosamente, detectar la IGFBP-1 en una muestra cuando su concentración es superior o igual a una concentración comprendida entre 5 y 30 ng/ml, preferiblemente comprendida entre 5 y 10 ng/ml.

En la presente invención, la detección de la IGFBP-1 se puede llevar a cabo en una muestra diluida tal como se ha definido anteriormente.

En la presente invención, la determinación del umbral de la IGFBP-1 se puede hacer usando una preparación de IGFBP-1 natural procedente de la empresa Hytest (Ref. 8IGB1).

20 Según la invención, el procedimiento de la invención puede comprender un ajuste de al menos uno de los parámetros seleccionados del volumen del medio tampón diluyente, pH del medio tampón, fuerza iónica del medio tampón, siendo dicho ajuste común para la AFP y la IGFBP-1.

25 Según la invención, el procedimiento de la invención puede comprender un ajuste de al menos uno de los parámetros seleccionados de la concentración de los anticuerpos de captura y/o la concentración de los anticuerpos marcados, siendo dicho ajuste específico para la AFP o la IGFBP-1.

30 La combinación del ajuste específico de la AFP y la IGFBP-1 y/o el ajuste común, permite ventajosamente la obtención de una complementariedad de la detección de la AFP y la IGFBP-1. La complementariedad de los dos marcadores puede ser, por ejemplo, cronológica, por ejemplo la AFP puede ser un marcador preferente antes de la semana 35 y la IGFBP-1 puede ser un marcador preferente más allá de la semana 37. La complementariedad puede también referirse a los rendimientos de detección de cada uno de los marcadores. Así pues, según la presente invención, los umbrales de detección de cada uno de los dos marcadores se pueden ajustar de modo que la AFP sea el marcador más sensible y la IGFBP-1 el más específico y/o viceversa.

35 Según la presente invención, también se pueden ajustar ventajosamente los parámetros citados antes de modo que la especificidad de la detección de los marcadores sea igual, es decir, que tengan el mismo nivel de especificidad. En este modo de realización, el marcador IGFBP-1 es estadísticamente el más sensible, en particular más allá de la semana 37 de amenorrea.

40 Según la invención, el procedimiento de la invención permite ventajosamente, por la complementariedad de los dos marcadores, detectar la rotura de membranas fetales incluso si la IGFBP-1 está ausente, por ejemplo, si el líquido amniótico está muy poco concentrado en IGFBP-1 o si la IGFBP-1 se ha degradado in vivo o in vitro, como ha descrito esto en particular en Rutanen et al. "Measurement of Insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical/vaginal secretions: comparison with the ROM-Check Membrane Immunoassay in the diagnosis of ruptured fetal membranes". *Clinica Chimica Acta*, 214 (1993), 73-81 [9], por la detección de la AFP.

45 Según la invención, el procedimiento de la invención permite ventajosamente, por la complementariedad de los dos marcadores, orientar el diagnóstico hacia una ausencia de rotura en el caso de resultado positivo para IGFBP-1 que no se debería a una pérdida de líquido amniótico sino a la presencia de IGFBP-1 procedente de las células deciduales del cuello uterino. En efecto, al contrario que la IGFBP-1, la AFP es una molécula de origen muy mayoritariamente fetal y por consiguiente no presenta riesgo de interferencia. La presencia de IGFBP-1 procedente de células deciduales del cuello uterino limita el interés de la IGFBP-1; esto se ha descrito en particular en los artículos: Rutanen et al. "Decidual transformation of human extrauterine mesenchymal cells is associated with is associated with the appearance of insulin like growth factor binding protein 1". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 72: 27-31 [10] Rutanen et al. "Evaluation of a rapid strip test for insulin-like growth factor binding protein 1 in the diagnosis of foetal ruptured membranes". *Clinica Chimica Acta*. 253; (1996) 91 -101 [11]. Por lo tanto, la presente invención permite ventajosamente disminuir el riesgo de detección de falsos positivos.

Según la invención, el procedimiento puede comprender además una etapa complementaria de detección solo de la

IGFBP-1.

La detección de la IGFBP-1 sola en la etapa complementaria se puede realizar con una sensibilidad superior a la detección de la IGFBP-1 cuando se realiza simultáneamente con la de la AFP.

5 En este modo de realización, el umbral de detección es tal que permite, en el marco de esta etapa complementaria, detectar la IGFBP-1 cuando su concentración es de 1 a 10 ng/ml, preferiblemente de 2 a 5 ng/ml.

Además, en este modo de realización, la detección de la IGFBP-1 se puede realizar en una solución diluida, por ejemplo, una solución diluida tal como se ha definido anteriormente.

En este modo de realización, los medios de detección de la IGFBP-1 son los definidos anteriormente, pueden ser, por ejemplo, los anticuerpos anti-IGFBP-1 definidos anteriormente.

10 Según la invención, el resultado es negativo, es decir no hay rotura, cuando no se detecta ni la IGFBP-1 ni la AFP, positivo, es decir hay rotura, cuando se detecta solo la IGFBP-1 o en combinación con la AFP. Cuando se detecta solo la AFP, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa complementaria de detección de la IGFBP-1 sola, como se ha indicado anteriormente.

15 Ventajosamente, según este modo de realización, el procedimiento de la invención permite eliminar todos los resultados falsos positivos. Además, el procedimiento de la invención en este modo de realización permite ventajosamente obtener una especificidad de 100% y una sensibilidad superior a 84%.

Según la invención, la muestra puede ser una muestra tomada en cualquier momento del embarazo. Por ejemplo, se puede tomar entre la semana 11 y el término del embarazo, por ejemplo de 11 a 42 semanas, de 15 a 41, de 20 a 40, de 25 a 40, de 30 a 40, de 35 a 40, de 37 a 40.

20 Ventajosamente, se puede obtener un resultado de certeza, es decir con una sensibilidad y una especificidad de 100% de una población global, exceptuando pacientes cuyo término es superior a 37 a 40 semanas, por ejemplo 39 semanas con AFP negativa y IGFBP-1 negativa, y pacientes cuyo término es inferior o igual a 37 a 40 semanas, por ejemplo 39 semanas, con AFP positiva y IGFBP-1 negativa.

25 Así, el resultado obtenido permite concluir la ausencia de rotura de las membranas fetales sin ninguna prueba clínica complementaria. En este modo de realización, el procedimiento de la invención permite obtener ventajosamente una sensibilidad y una especificidad de 100% del procedimiento de detección.

Por lo tanto, el procedimiento de la invención permite obtener un resultado fiable que no necesita ninguna etapa complementaria de confirmación y permite concluir con certeza en cuanto a la rotura o no de las membranas fetales.

30 Por lo tanto, el procedimiento de la invención permite obtener ventajosamente para una población de pacientes claramente definida, es decir cuyo término es superior o inferior a 39 semanas de amenorrea, un resultado fiable que no necesita ninguna etapa complementaria de confirmación y permite concluir con certeza en cuanto a la rotura o no de las membranas fetales.

Este documento tiene también por objeto un dispositivo, por ejemplo, inmunocromatográfico para llevar a cabo el procedimiento según la invención, que comprende:

- 35
- una zona (1) de depósito de una muestra
  - una zona (2) que comprende anticuerpos anti-IGFBP-1 y anticuerpos anti-AFP marcados
  - una zona (3) de revelado que comprende anticuerpos de captura anti-AFP y anticuerpos de captura anti-IGFBP-1.

La presente invención tiene también por objeto el uso del dispositivo que comprende:

- 40
- a. una zona (1) de depósito de una muestra
  - b. una zona (2) que comprende anticuerpos anti-IGFBP-1 y anticuerpos anti-AFP marcados.
  - c. una zona (3) de revelado que comprende anticuerpos de captura dirigidos contra AFP y anticuerpos de captura dirigidos contra IGFBP-1, para llevar a cabo el procedimiento de detección in vitro de una rotura de membranas fetales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

45 Según la invención, la zona (1) de depósito puede ser una zona adaptada para la aplicación o la recepción de la muestra. Esta zona puede ser de cualquier forma conocida para el experto en la técnica, por ejemplo un depósito, una cúpula, un pocillo, una mecha, una superficie plana.

Según la invención, la zona (1) de depósito puede ser móvil y/o estar unida a la zona (2) o (3). Cuando la zona (1) es móvil, se puede usar, por ejemplo, para realizar la toma de muestra y aplicar en la zona (2). Cuando la zona (1) está unida a la zona (2) o (3), esta se puede sumergir directamente en un recipiente que comprende la muestra y/o la

muestra se puede aplicar sobre esta zona. Un ejemplo de este dispositivo se ilustra más adelante.

Ventajosamente, según la invención, las zonas (1) y (2) están situadas sobre un mismo soporte.

5 Según la invención, los materiales de las zonas (1) a (3) pueden ser iguales o diferentes. Los materiales pueden ser cualquier material conocido para el experto en la técnica, por ejemplo, un material seleccionado del grupo que comprende papel absorbente, algodón, celulosa, fibra de vidrio, una membrana de nitrocelulosa.

Preferiblemente, la zona de depósito (1) puede ser un papel absorbente o fibra de vidrio.

Preferiblemente, la zona (2) que comprende anticuerpos anti-IGFBP-1 y anticuerpos anti-AFP marcados puede ser de fibra de vidrio.

Preferiblemente, la zona de revelado (3) puede ser una membrana de nitrocelulosa.

10 Según la invención, los anticuerpos de captura anti-AFP o anti-IGFBP-1 se pueden fijar, por ejemplo, directamente sobre el soporte de la zona (3), por ejemplo por acoplamiento químico y/o por depósito como se ha descrito anteriormente.

15 Según la invención, la zona de fijación del anticuerpo de captura de la AFP y del anticuerpo de captura de la IGFBP-1 pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, la zona de fijación del anticuerpo de captura de la AFP es diferente de la del anticuerpo de captura de la IGFBP-1. Pueden ser, por ejemplo, dos bandas paralelas que comprende cada una un anticuerpo de captura diferente.

20 Según la invención, las diferentes zonas (1) a (3) citadas antes se pueden fijar sobre un soporte sólido, por ejemplo, sobre tarjetas laminadas y/o estar comprendidas en un contenedor que comprende un orificio a nivel de la zona (3) que permite la visualización del resultado y un orificio a nivel de la zona (1) de depósito de la muestra, que permite el depósito de la muestra. Un ejemplo de este dispositivo se ilustra más adelante.

Según la invención, el dispositivo puede comprender además una zona (4) de absorción. Según la invención, la zona de absorción (4) puede ser cualquier soporte sólido absorbente conocido por el experto en la técnica. Puede ser, por ejemplo, un papel secante absorbente, una esponja, un algodón, un fieltro o un textil sintético.

25 Ventajosamente, según la invención, los soportes de las zonas (1) y (2) se solapan en uno de sus extremos y el otro extremo de la zona (2) se solapa con un extremo de la zona (3). El solapamiento de las diferentes zonas (1) a (3) permite ventajosamente durante la aplicación de la muestra y/o la inmersión del extremo libre de la zona (1) en la muestra, la migración por capilaridad de la muestra a las diferentes zonas. Preferiblemente, las zonas (1) y (2) están dispuestas sobre un mismo soporte. Un ejemplo de este dispositivo se ilustra más adelante.

30 Preferiblemente, la zona (4) de absorción se solapa con el extremo libre de la zona (3). Así, la zona (4) permite una migración acelerada de la muestra a través de las diferentes zonas del dispositivo. Ventajosamente, la zona (4) permite absorber el excedente de líquido de la muestra.

35 Según la invención, las diferentes zonas (1) a (4) se pueden recubrir independientemente con una película de protección. Puede ser, por ejemplo, una película plástica, por ejemplo una película de poli(cloruro de vinilo) (PVC), una película biodegradable, por ejemplo una película de policaprolactona (PCL), un poli(alcohol vinílico) (PVA), y poli(ácido láctico) (PLA).

La película permite ventajosamente proteger independientemente las diferentes zonas del dispositivo de la invención.

Según la invención, la película puede ser una película única o varias películas que recubren independientemente una de dichas zonas (1) a (4).

40 Según la invención, la película o las películas pueden recubrir parcialmente el dispositivo de la invención dejando así algunas zonas no cubiertas. Según la invención, la película o las películas pueden ser películas desprendibles que se pueden retirar antes de usar el dispositivo. Según la invención, la película puede comprender una inscripción en su superficie que permite ventajosamente una identificación del dispositivo.

45 Este documento tiene también por objeto un estuche para llevar a cabo el procedimiento de la invención, que comprende:

- anticuerpos de captura anti-AFP y anti-IGFBP-1 como se han definido anteriormente
- anticuerpos marcados anti-AFP y anti-IGFBP-1 como se han definido anteriormente.

El estuche puede comprender además un medio de toma de muestra, por ejemplo, un hisopo como se ha definido anteriormente.

50 El estuche puede comprender además un soporte sólido sobre el que se pueden fijar anticuerpos de captura como



se han definido anteriormente.

La presente invención permite ventajosamente detectar las roturas de membranas fetales cualquiera que sea su importancia, por ejemplo, se trata de microrroturas y/o de macrorroturas y/o cualquiera que sea el volumen de líquido amniótico tomado.

- 5 La presente invención permite ventajosamente disminuir la probabilidad de obtener resultados falsos negativos así como resultados falsos positivos.

Además, la presente invención permite ventajosamente detectar roturas de las membranas fetales cualquiera que sea la fase del embarazo.

- 10 La presente invención permite además una detección fiable cualquiera que sea la fase del embarazo, de la variación de la concentración de la AFP y/o IGFBP-1 en el líquido amniótico y/o el volumen de líquido amniótico presente en la muestra vaginal o de cuello uterino.

Podrán aparecer otras ventajas para el experto en la técnica con la lectura de los siguientes ejemplos, ilustrados por las figuras adjuntas, dados a modo de ilustración.

### Breve descripción de los dibujos

- 15 - La figura 1 representa una vista de frente (A) y una vista de perfil de un dispositivo según la invención, que comprende una zona (1) de fibra de vidrio (11), una zona (2) de fibra de vidrio (12) que comprende anticuerpos anti-IGFBP-1 y anticuerpos anti-AFP marcados (12), una zona (3) de membrana de nitrocelulosa (13), que comprende anticuerpos de captura anti-AFP (17) y anticuerpos de captura anti-IGFBP-1 (18) y una zona (4) de papel absorbente (14), una película (15) (16)
- 20 - La figura 2 representa un dispositivo comprendido en un recipiente (23) que comprende un orificio (21) a nivel de la zona (1) y un orificio (22) a nivel de la zona (3), que comprende anticuerpos de captura anti-AFP (24) y anticuerpos de captura anti-IGFBP-1 (25).

### Ejemplos

- 25 Ejemplo 1: Procedimiento de detección de la rotura de membranas fetales gracias a un dispositivo de inmunofiltración

Se preparan anticuerpos anti-AFP (ABAFP-0404, clon 4 Arista Biologicals) diluidos a 0,75 mg/ml en un tampón de PBS así como anticuerpos anti-IGFBP-1 (I 2032, clon 33627.11, SIGMA ALDRICH) diluidos a 0,75 mg/ml en un tampón de PBS.

- 30 Los anticuerpos se depositan mediante un dispensador automático de reactivos (Isoflow Dispenser, Imagene Technology Inc. (marca registrada)) en forma de líneas paralelas sobre una membrana de nitrocelulosa y después se secan en estufa a 37°C, en atmósfera con una tasa de humedad controlada inferior a 30%. Después la membrana se recorta en múltiples tiras de aproximadamente 1 cm de ancho y 2,5 cm de largo. Después cada tira se coloca sobre un soporte absorbente puesto sobre una base de plástico. Después se pone sobre la base una cubierta de plástico que se adapta a la base, y se cierra mediante presión manual. La cubierta de plástico dispone de una
- 35 ventana de abertura cuya superficie es inferior a la superficie de la membrana. La membrana se ha colocado de modo que la zona de abertura de la ventana de la cubierta esté situada totalmente encima de la membrana. La cubierta está concebida de modo que ejerza presión sobre la membrana y el soporte absorbente con el fin de que los diferentes elementos del dispositivo mantengan la posición definida en el cierre de la cubierta.

- 40 Se lleva a cabo una toma de muestra con un hisopo estéril cuya punta es de poliéster en una mujer embarazada de 24 semanas de amenorrea.

Después la punta se introduce en un tubo de rosca de 5 ml (Dustcher) que comprende 2 ml de una solución de extracción que contiene borato 50 mM (02102391, Biosolve), albúmina de suero bovino al 1% (BSA) (AP-4510-01, Seracare Life Sciences), triton X-100 al 0,05% (pH 9,3) y se agita mediante movimientos circulares durante 30 segundos a 1 minuto. A continuación se retira el hisopo del tubo.

- 45 Después la solución de extracción se vierte en la ventana de la cubierta. La solución es filtrada a través de la membrana y absorbida por el soporte absorbente. La AFP y/o la IGFBP-1 contenidas en la solución de extracción se unen con los anticuerpos de captura respectivos. En la siguiente etapa, un reactivo de revelado que contiene anticuerpos anti-AFP, clon 3, Arista Biologicals, ABAFP-0403, y anti-IGFBP-1, clon 6302 (7B11), AbD Serotech, 5345-4859X, paratopos diferentes de los anticuerpos de captura y marcados con oro coloidal, se une a los antígenos de AFP y/o IGFBP-1 capturados. Esto lleva a la aparición de una coloración malva a nivel de las líneas de pruebas. Se lleva a cabo una etapa de lavado con una solución de lavado que contiene, por ejemplo, PBS-Tween-20 al 10%, mediante vertido de la solución de lavado en la ventana para eliminar cualquier fijación no específica de partículas de oro coloidal. La presencia de líneas coloreadas malvas a nivel de las líneas de AFP y/o IGFBP-1 es indicativa de la rotura de membranas fetales.
- 50

## ES 2 531 436 T3

Ejemplo 2: Dispositivo inmunocromatográfico para detectar la rotura de membranas fetales

Se preparan las tiras a partir de tarjetas laminadas de 30 cm x 9,5 cm (CNPC-SS12 R-032/2, MDI (marca registrada)) constituidas por un soporte de materia plástica recubierto de una capa de adhesivo sobre la que se montan la membrana de nitrocelulosa, el papel absorbente y la fibra de vidrio.

5 Mediante un dispensador automático de reactivos (Isoflow Dispenser, Imagen Technology Inc. (marca registrada)), se depositan anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (ABGAM-0500, Arista Biologicals (marca registrada)) diluidos a 4 mg/ml en un tampón de PBS, anticuerpos anti-AFP (ABAFP-0404, clon 4 Arista Biologicals) diluidos a 0,75 mg/ml en un tampón de PBS, así como anticuerpos anti-IGFBP-1 (I2032, clon 33627.11, SIGMA ALDRICH (marca registrada)) diluidos a 0,75 mg/ml, en un tampón de BS, con un caudal de 0,5 µl/cm en forma de líneas paralelas separadas 5 mm y de una anchura de 1 a 2 mm cada, una sobre una membrana de nitrocelulosa cuya anchura es de 25 mm (zona (1)).

Después del depósito de estos medios de búsqueda, estas tarjetas se ponen entonces 30 min en una estufa a 37°C en atmósfera con una tasa de humedad controlada inferior a 30% para secarlas.

15 Se prepara la mezcla de conjugado, es decir, una solución que comprende anticuerpos marcados, a partir de los anticuerpos anti-IGFBP-1 (5345-4859X, clon 6302 (7B11), AbD Serotech (marca registrada)) y anti-AFP (ABAFP-0403, clon 3, Arista Biologicals (marca registrada)) previamente acoplados a partículas de látex (DBK1040CB, 0,39 µm de diámetro, Duke Scientific Corporation (marca registrada)) según las indicaciones del proveedor o las siguientes instrucciones:

20 Las partículas de látex (150 µl) se lavan dos veces con 1 ml de PBS por centrifugación durante 30 min a 14000 revoluciones por minuto (rpm) en tubos Eppendorf (marca registrada) de 1,5 ml. En la última etapa de lavado, las partículas de látex se vuelven a poner en suspensión en la misma solución. Las partes carboxiladas de las perlas se activan entonces mediante 50 µg de hidrócloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC, E1769, SIGMA-ALDRICH (marca registrada)). Después de 15 minutos de activación, la solución de anticuerpos se añade a razón de 10 µg/mg de partículas de látex. La solución así obtenida se agita suavemente durante 2 h a temperatura ambiente en un agitador circular adaptado a los tubos de 1,5 ml. Después una etapa de centrifugación durante 15 min a 14000 revoluciones por minuto permite recuperar las partículas de látex conjugadas a los anticuerpos. Con el fin de evitar interacciones no específicas, el sedimento se recoge en 1 ml de una solución de saturación (pH 7,4) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (S7907, SIGMA ALDRICH (marca registrada)), BSA al 1% (AP-4510-01, Seracare Life Sciences (marca registrada)). La solución se agita en el agitador circular 1 h a temperatura ambiente y después se pone en la estufa durante 30 min a 37°C. La solución se centrifuga una última vez durante 15 min a 14000 revoluciones por minuto. El sedimento así obtenido se vuelve a poner en suspensión en la misma solución de saturación.

35 A una solución de 250 µl de solución de conjugado de IGFBP-1 (anticuerpos anti-IGFBP-1 marcados) con 250 µl añadidos de conjugado de AFP (anticuerpos anti-AFP marcados), se añade un volumen de la solución de saturación (pH 7,4) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (S7907, SIGMA ALDRICH (marca registrada)), albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (AP-4510-01, Seracare Life Sciences (marca registrada)) csp 1 ml, sacarosa al 20% (S8501, SIGMA ALDRICH) y trehalosa al 5% (T9531, SIGMA ALDRICH (marca registrada)). La mezcla así obtenida se agita 15 min a temperatura ambiente en el agitador circular adaptado a los tubos de 1,5 ml.

Los anticuerpos se acoplaron así a dichas partículas de látex y corresponden a ejemplos de anticuerpos marcados.

40 La mezcla de anticuerpos acoplados a las micropartículas de látex después se pulveriza con un caudal de 4 µl/cm sobre hojas de fibra de vidrio (zona (3)) de dimensiones de 30 cm x 3,2 cm (n° 8964, AHLSTROM, Arista Biologicals (marca registrada)) previamente tratadas con una solución de B<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 M (B3545, SIGMA ALDRICH (marca registrada)), triton X-100 al 1% (X-100, SIGMA ALDRICH (marca registrada)) pH 8,4.

45 La fijación de esta mezcla de conjugados sobre la hoja de fibra de vidrio se lleva a cabo con el mismo aparato Isoflow Dispenser (marca registrada) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Después de la pulverización, las hojas de fibra de vidrio se secan media hora a 37°C.

50 El ensamblado de las tarjetas se hace mediante unión de la fibra de vidrio impregnada del conjugado sobre la parte adhesiva inferior de la tarjeta haciendo que la hoja de fibra de vidrio solape de 1 a 3 mm sobre la membrana de nitrocelulosa. De la misma forma, se pone un papel de alto poder de absorción (zona 2) (absorbant pad, Ahlstrom 222, MAPDS-0100, Arista Biologicals) de dimensiones de 30 cm X 4,2 cm sobre la parte superior de la tarjeta y solapando la membrana de nitrocelulosa de 1 a 3 mm con el fin de poder crear un flujo de migración. Se coloca después una etiqueta autoadhesiva sobre las dos clases de papel que tiene como función proteger e identificar las tiras.

55 La tarjeta así montada se recorta en tiras de 4 mm de ancho mediante una guillotina (GCI-800, Zeta Corporation) o un aparato de múltiples hojas circulares (Rotary cutter, Arista Biologicals Inc). Una tira está representada por el siguiente esquema:

Ejemplo 3: Ejemplo de uso de un dispositivo para llevar a cabo en procedimiento de la invención

1. En un tubo de rosca de 5 ml (015610, Dustcher), se introdujo una solución de 2,5 ml de borato 50 mM (02102391, Biosolve), BSA al 1% (AP- 4510-01, Seracare Life Sciences), triton X-100 al 0,05% (pH 9,3),

5 2. La muestra se tomó con un hisopo estéril cuya punta es de poliéster, y se depositó sobre el dispositivo descrito en el ejemplo 2,

3. El dispositivo obtenido se introdujo en el tubo de rosca citado antes,

4. El resultado se obtiene después de 10 min de migración.

La prueba es positiva cuando al menos una de las dos bandas correspondientes a la AFP y IGFBP-1 se colorea.

10 Cuando la prueba es positiva, la veracidad de la prueba se puede verificar con un examen ginecológico completo que permite confirmar o negar el resultado.

Ejemplo 4: Comparación de la estabilidad de la AFP y la IGFBP-1 frente a proteasas, realizada mediante un dispositivo que lleva a cabo el procedimiento de la invención.

15 En este ejemplo, el dispositivo inmunocromatográfico descrito en el ejemplo 2 se modifica y se usa un sistema de marca con oro coloidal para la detección de moléculas de IGFBP-1 y AFP. Se han seleccionado las parejas de anticuerpos anti-IGFBP-1 y anti-AFP en la lista de anticuerpos presentados en la descripción de la invención.

20 Se depositan 2 µl y 10 µl de un líquido amniótico en dos tubos distintos que contiene cada uno 2,5 ml de solución de extracción. Después se añaden 200 µl de orinas recientes a cada uno de los dos tubos. Después las tiras se depositan en la solución de extracción según las modalidades descritas en el ejemplo 3 anterior. Los tubos que contienen la solución de extracción después se ponen a 37°C y se hacen ensayos a las 24 h, 48 h y 6 días. La muestra de líquido amniótico se seleccionó por su propiedad de generar señales de partida (en el tiempo T0) de igual intensidad sobre las bandas de AFP y IGFBP-1.

25 En el tubo que contiene 2 µl de líquido amniótico, después de 24 h de incubación, la señal de IGFBP-1 ha disminuido de forma significativa mientras que la señal de AFP solo al disminuido ligeramente. Después de 48 h de incubación, la señal de IGFBP-1 ha desaparecido, mientras que la intensidad de la señal de AFP no ha evolucionado en relación con la lectura precedente de 24 h. A los 6 días, la señal de AFP sigue siendo visible y no ha cambiado mientras que la señal de IGFBP-1 está ausente.

30 En el tubo que contiene 10 µl de líquido amniótico, después de 24 de incubación, las señales de IGFBP-1 y AFP permanecen sin cambio. Después de 48 h de incubación, la señal de IGFBP-1 ha disminuido mientras que la señal de AFP no ha evolucionado. A los 6 días, la señal de AFP sigue sin cambio mientras que la señal de IGFBP-1 se ha atenuado mucho y solo aparece en forma de traza.

Ejemplo 5: Comparación de los rendimientos de la asociación de AFP/IGFBP-1 frente a solo IGFBP-1

35 Se ha llevado a cabo un estudio prospectivo desde el 17 de noviembre de 2010 al 15 de enero de 2011 entre un grupo de 102 pacientes. Se incluyeron todas las pacientes que consultaron por sospecha de pérdida de líquido amniótico más allá de las 12 semanas de amenorrea (SA) y para las que el médico después de un examen clínico con espéculo, mantenía una indicación de realizar una prueba biológica de búsqueda del líquido amniótico. Las pacientes que presentaban metrorragias no eran elegibles. La toma de muestra consistía en recoger las secreciones presentes a nivel del fondo de saco vaginal con dos hisopos en paralelo: el hisopo estéril de poliéster (25-806, Pur-Wraps (marca registrada) Puritan) usado con el dispositivo que lleva a cabo el procedimiento de la invención y el hisopo de ACTIM® (marca registrada) PROM (25-806, Pur-Wraps (marca registrada) Puritan) usado con la prueba ACTIM PROM.

45 ACTIM® (marca registrada) PROM (Medix Biochemica (marca registrada)) es una prueba inmunocromatográfica que usa dos anticuerpos dirigidos contra la IGFBP-1 humana. Uno está fijado sobre partículas de látex azules y el otro está inmovilizado sobre la membrana de la tira formando una línea de captura. El hisopo se sumerge en 0,5 ml de la solución de extracción proporcionada en el kit (solución tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino, inhibidores de proteasas así como conservantes). Se agita enérgicamente durante 10 segundos. La tira se sumerge hasta que el frente del líquido llega al nivel de la zona de resultados y después se retira. La lectura se hace después de 5 min de migración.

Un resultado se considera positivo si aparecen dos líneas azules, lo que se traduce por la presencia de IGFBP-1 a un nivel superior a 25 µg/ml.

50 El dispositivo que lleva a cabo el procedimiento de la invención es una prueba inmunocromatográfica que usa un sistema de marcaje con oro coloidal de anticuerpos anti-AFP y anti-IGFBP-1 y la inmovilización de anticuerpos de AFP y IGFBP-1 sobre la membrana de la tira para la detección de moléculas de IGFBP-1 y de AFP en dos líneas distintas. En este ejemplo, el hisopo se sumergió durante 10 segundos en un tubo de rosca de 2 ml (015610,

Dustcher) con 0,5 ml de solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (P4417, Sigma Aldrich), BSA al 1% (AP-4510-01, Seracare Life Sciences), triton al 0,05% (X-100, Sigma Aldrich) pH 7,4. Esta muestra diluida se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta que se había recogido el conjunto de las muestras. Cuando se realizó la prueba, el dispositivo que lleva a cabo el procedimiento de la invención se introdujo en el tubo de rosca citado antes. El resultado se leyó después de 10 min de migración.

Las tiras se prepararon a partir de tarjetas laminadas de 30 cm X 9,5 cm (CNPC-SS12 R-032/2, MDI (marca registrada)) constituidas por un soporte de materia plástica recubierto de una capa de adhesivo sobre la que se montaron la membrana de nitrocelulosa, el papel absorbente y la fibra de vidrio.

Mediante un dispensador automático de reactivos (Isoflow Dispenser, Imogene Technology Inc. (marca registrada)), anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (ABGAM-0500, Arista Biologicals (marca registrada)) diluidos a 2 mg/ml en un tampón de PBS pH 7,4,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,015 M (P4417, Sigma (marca registrada)), NaCl 0,15 M (S7653, Sigma (marca registrada)), anticuerpos anti-AFP que se seleccionaron de la siguiente lista: empresa Anticorps en Ligne (número de catálogo ABIN93624), anticuerpos comercializados por la empresa Arista Biologicals (clon 1, número de catálogo ABAFP-0401; clon 2, número de catálogo ABAFP-0402; clon 3, número de catálogo ABAFP-0403; clon 4, número de catálogo ABAFP-0404), anticuerpos comercializados por la empresa Hytest (clon 5H7, clon 4A3 y clon XA2, número de catálogo 4F16; anticuerpos policlonales, número de catálogo ABAFP-0501) diluidos a 1 mg/ml en un tampón de PBS, así como anticuerpos anti-IGFBP-1 que se seleccionaron de la siguiente lista: anticuerpos anti-IGFBP-1 comercializados por la empresa Lenco Technologies (número de catálogo I-695, I-746 y I-805), anticuerpos anti-IGFBP-1 comercializados por la empresa SIGMA ALDRICH (número de catálogo I 2032, clon 33627.11), anticuerpos comercializados por la empresa AbD Serotech (número de catálogo 5345-4859X, clon 6302 (7B11); número de catálogo 5345- 4809X, clon 7B10), anticuerpos comercializados por la empresa Hytest (número de catálogo 4I52; clon A8 y clon G2; número de catálogo 4IG8; clon G5F8 y clon C7B9) diluidos a 0,5 mg/ml en un tampón de PBS, se depositaron con un caudal de 1  $\mu\text{l}/\text{cm}$  en forma de líneas paralelas separadas 5 mm y de una anchura de 1 a 2 mm cada una, sobre una membrana de nitrocelulosa cuya anchura es de 25 mm (zona (1)).

Después del depósito de estos medios de búsqueda, estas tarjetas se pusieron entonces 30 min en una estufa a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera con una tasa de humedad controlada inferior a 30% para secarlas.

La mezcla de conjugado, es decir una solución que comprende anticuerpos marcados, se preparó a partir de los anticuerpos anti-IGFBP-1 que se seleccionaron de la siguiente lista: anticuerpos anti-IGFBP-1 comercializados por la empresa Lenco Technologies (número de catálogo I-695, I-746 y I-805), anticuerpos anti-IGFBP-1 comercializados por la empresa SIGMA ALDRICH (número de catálogo I 2032, clon 33627.11), anticuerpos comercializados por la empresa AbD Serotech (número de catálogo 5345-4859X, clon 6302 (7B11); número de catálogo 5345- 4809X, clon 7B10), anticuerpos comercializados por la empresa Hytest (número de catálogo 4I52; clon A8 y clon G2; número de catálogo 4IG8; clon G5F8 y clon C7B9) y anti-AFP que se seleccionaron de la siguiente lista: (empresa Anticorps en Ligne (número de catálogo ABIN93624), anticuerpos comercializados por la empresa Arista Biologicals (clon 1, número de catálogo ABAFP-0401; clon 2, número de catálogo ABAFP-0402; clon 3, número de catálogo ABAFP-0403; clon 4, número de catálogo ABAFP-0404), anticuerpos comercializados por la empresa Hytest (clon 5H7, clon 4A3 y clon XA2, número de catálogo 4F16; anticuerpos policlonales, número de catálogo ABAFP-0501) previamente acoplados a partículas de oro coloidal según el siguiente protocolo:

A 100 ml de agua destilada, se añadió 1,0 ml de solución de cloruro de oro al 1% (G4022, Sigma Aldrich). El agua se calentó hasta el punto de ebullición y se añadieron 2,5 ml de solución de citrato sódico al 1% (S1804, Sigma Aldrich). La solución se volvió incolora y después viró a púrpura. Al cabo de 1 minuto, la solución se calentó hasta volverse rojo cereza. Se añadieron 9,5 ml de citrato sódico al 1% (S1804, Sigma Aldrich). El agua se calentó hasta el punto de ebullición y se añadieron 8,6 ml de solución de cloruro de oro al 1% (G4022, Sigma Aldrich). La solución se volvió azul oscuro casi negro, después púrpura y después se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se ajustó el pH, por una parte mediante una solución de carbonato potásico 0,2 M (269619, Sigma Aldrich), de 10 ml de la solución de oro coloidal púrpura previamente obtenida, hasta alcanzar pH 7,8; y por otra parte ajustada mediante una solución de carbonato potásico 0,2 M (269619, Sigma Aldrich), de 10 ml de solución de oro coloidal púrpura a pH 7,3. Se añadieron 200  $\mu\text{g}$  de anti-IGFBP-1 a 1 ml de agua destilada y después se añadieron rápidamente 10 ml de solución de oro coloidal púrpura al pH ajustado a 7,8. Se añadieron 200  $\mu\text{g}$  de anti-AFP a 1 ml de agua destilada y después se añadieron rápidamente 10 ml de solución de oro coloidal púrpura al pH ajustado a 7,3. Estos tubos se pusieron sobre un agitador circular (SB2, STUART (marca registrada)) durante 20 minutos. Se añadieron 1 ml de solución de BSA al 10% (AP-4510-01, Seracare Life Sciences (marca registrada)) y 50  $\mu\text{l}$  de la solución de PEG al 10% (81275, Sigma Aldrich (marca registrada)). Se centrifugaron los 2 tubos (5804, Eppendorf (marca registrada)) a 4000 rpm durante 30 minutos. Se aspiró el líquido sobrenadante con una bomba de vacío (159600, BRAND (marca registrada)) y el sedimento se recogió con 1 ml de tampón de resuspensión (pH 8,0) TRIS BASE 20 mM (26-128-3094, Euromedex (marca registrada)), NaCl 50 mM (S7653, Sigma Aldrich (marca registrada)), BSA al 0,2% (AP-4510-01, Seracare Life Sciences (marca registrada)), sacarosa al 10% (S8501, Sigma Aldrich), trehalosa al 5% (T9531, Sigma Aldrich (marca registrada)).

A 250  $\mu\text{l}$  de solución de conjugado de IGFBP-1 con 250  $\mu\text{l}$  añadidos de conjugado de AFP, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de la solución de saturación (pH 7,4)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (S7907, SIGMA ALDRICH (marca registrada)), albúmina de suero

## ES 2 531 436 T3

bovino (BSA) al 1% (AP-4510-01, Seracare Life Sciences (marca registrada)), sacarosa al 20% (S8501, Sigma Aldrich), trehalosa al 5% (T9531, Sigma Aldrich (marca registrada)). La mezcla así obtenida se agitó 15 min a temperatura ambiente en el agitador circular adaptado a tubos de 1,5 ml.

5 De esta forma los anticuerpos se acoplaron con dichas partículas de oro coloidal y corresponden a ejemplos de anticuerpos marcados.

La mezcla de anticuerpos acoplados a las micropartículas de oro se pulverizó después con un caudal de 4 µl/cm sobre hojas de fibra de vidrio (zona (3)) de dimensiones de 30 cm X 3,2 cm (n° 8964, AHLSTROM, Arista Biologicals (marca registrada)) previamente tratadas con una solución de  $B_4Na_2O_7$  0,1 M (B3545, SIGMA ALDRICH (marca registrada)), triton X-100 al 1% (X-100, SIGMA ALDRICH (marca registrada)) pH 8,4.

10 La fijación de esta mezcla de conjugados sobre la hoja de fibra de vidrio se realizó en el mismo aparato Isoflow Dispenser (marca registrada) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Después de la pulverización, las hojas de fibra de vidrio se secaron media hora a 37°C.

15 El montaje de las tarjetas se hizo por unión de la fibra de vidrio impregnada con el conjugado sobre la parte adhesiva inferior de la tarjeta haciendo que la hoja de fibra de vidrio solapara de 1 a 3 mm sobre la membrana de nitrocelulosa. De la misma forma, se puso un papel de alto poder de absorción (zona 2) (absorbant pad, Ahlstrom 222, MAPDS-0100, Arista Biologicals) de dimensiones de 30 cm X 4,2 cm sobre la parte superior de la tarjeta y solapando la membrana de nitrocelulosa de 1 a 3 mm con el fin de poder crear un flujo de migración. Se colocó después una etiqueta autoadhesiva sobre las dos clases de papel que tenía como función proteger e identificar las tiras.

20 La tarjeta así montada se recortó en tiras de 4 mm de ancho mediante una guillotina (GCI-800, Zeta Corporation) o un aparato de múltiples hojas circulares (Rotary cutter, Arista Biologicals Inc).

La siguiente tabla 1 detalla ejemplos de resultados obtenidos, así como las interpretaciones correspondientes por el obstetra:

| N° de muestra | TÉRMINO  | Procedimiento del estado de la técnica |                | Dispositivo de la invención |          |                | Opinión obstetra |
|---------------|----------|--|----------------|-----------------------------|----------|----------------|------------------|
|               |          | INTERPRETACIÓN                         | INTERPRETACIÓN | IGFBP-1                     | AFP      | INTERPRETACIÓN |                  |
| 101           | 27 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 103           | 35 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 104           | NC       | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 105           | 28 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 106           | 26 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 107           | 39 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 109           | 41 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 111           | 40 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 112           | 40 SA+4d | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 113           | 30 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 114           | 36 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 115           | 34 SA+4d | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 116           | 22 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 117           | 26 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 118           | 40 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 119           | 40 SA+2d | POSITIVO                               | POSITIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 120           | 40 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 122           | 36 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 123           | 39 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 124           | 37 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 125           | 41 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 126           | 39 SA+2d | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 129           | 30 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 130           | 33 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 131           | 12 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 132           | 37 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 133           | 31 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 134           | 38 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 135           | 33 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 136           | 41 SA+4d | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 137           | 37 SA+6d | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 139           | 30 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 140           | 41 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 141           | 41 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | POSITIVO         |
| 143           | 40 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| 144           | 40 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 145           | 23 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 146           | 30 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| 147           | 40 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |

| N° de muestra | TÉRMINO  | Procedimiento del estado de la técnica |                | Dispositivo de la invención |          | Opinión obstetra |
|---------------|----------|--|----------------|-----------------------------|----------|------------------|
|               |          | INTERPRETACIÓN                         | INTERPRETACIÓN | IGFBP-1                     | AFP      |                  |
| 148           | 41 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO         |
| 150           | 38 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 151           | 16 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 152           | 16 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 154           | 36 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 155           | 40 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 156           | 34 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 157           | 38 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 158           | 36 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 159           | 29 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 161           | 18 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 163           | 32 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 164           | 39 SA+6d | POSITIVO                               | POSITIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO         |
| 165           | 40 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO         |
| 166           | 41 SA+3d | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 167           | 32 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 168           | 16 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 169           | 28 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 170           | 40 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 171           | 33 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 172           | 20 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 173           | 39 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 174           | 41 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 175           | 41 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO         |
| 176           | 40 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO         |
| 178           | 38 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 180           | 24 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 181           | 41 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 182           | 40 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO         |
| 183           | 39 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO         |
| 184           | 41 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO         |
| 185           | 31 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 186           | 34 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| 187           | 33 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| GM101         | 40 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| GM102         | 41 SA    | POSITIVO                               | POSITIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO         |
| GM103         | 38 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| GM104         | 37 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| GM106         | 38 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| GM107         | 38 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |
| GM108         | 23 SA    | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO         |

| N° de muestra | TÉRMINO | Procedimiento del estado de la técnica |                | Dispositivo de la invención |          |                | Opinión obstetra |
|---------------|---------|--|----------------|-----------------------------|----------|----------------|------------------|
|               |         | INTERPRETACIÓN                         | INTERPRETACIÓN | IGFBP-1                     | AFP      | INTERPRETACIÓN |                  |
| GM109         | 32 SA   | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| GM111         | 34 SA   | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| GM114         | 41 SA   | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| GM115         | 40 SA   | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| GM116         | 40 SA   | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | POSITIVO         |
| GM117         | 37 SA   | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| GM120         | 28 SA   | NEGATIVO                               | NEGATIVO       | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO         |
| GM121         | 39 SA   | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |
| GM122         | 18 SA   | POSITIVO                               | POSITIVO       | POSITIVO                    | POSITIVO | POSITIVO       | POSITIVO         |

Nota: SA = semana de amenorrea



5 La interpretación del médico se dio después del final del embarazo teniendo todo el informe, lo que incluía los datos clínicos y ecográficos del momento en que se realizó la prueba y también los sucesos ocurridos a continuación hasta el nacimiento. El diagnóstico de rotura no se mantenía cuando no había ningún flujo visible con el espéculo a pesar de una prueba de tos, la cantidad de líquido permanecía normal en la ecografía y la paciente regresaba a su domicilio sin un nuevo episodio de flujo durante al menos 48 h, o que se percibiera claramente una bolsa de las aguas sin flujo clínico para las pacientes que entraban en parto en un plazo de 48 h. Se daba una opinión de rotura cuando se había indicado un flujo y el examen con espéculo con la prueba de tos objetivaba un flujo y/o cuando no se percibía la bolsa de las aguas incluso durante el parto en las 48 horas siguientes a la prueba. Las pacientes sin flujo objetivable con oligoamnios en la ecografía eran objeto de un seguimiento cercano (cada 48 h) o de una inducción de parto en 48 h. El diagnóstico de rotura se mantenía si el flujo se repetía formalmente en 48 h o si la bolsa de las aguas no se percibía incluso durante el parto para las pacientes con parto inducido.

10 La veracidad de la prueba se pudo verificar por un examen ginecológico completo que permitía confirmar o negar el resultado.

15 El 21,6% de las muestras (22 casos de 102) presentan una discrepancia entre uno de los tres marcadores y los datos clínicos que representan la opinión del obstetra.

La siguiente tabla 2 describe ejemplos de los resultados de los datos clínicos y la tabla 3 los datos clínicos y la interpretación por el médico.

Tabla 2: tabla de ejemplos de los resultados con los datos clínicos para casos no concordantes

| N° de muestra              | Término   | Procedimiento del estado de la técnica |          | Dispositivo de la invención |          | INTERPRETACIÓN | Datos clínicos |
|----------------------------|-----------|--|----------|-----------------------------|----------|----------------|----------------|
|                            |           | INTERPRETACIÓN                         | IGFBP-1  | IGFBP-1                     | AFP      |                |                |
| 119                        | 40 SA+2d  | POSITIVO                               | NEGATIVO | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO       |
| 163                        | 32 SA     | POSITIVO                               | NEGATIVO | NEGATIVO                    | NEGATIVO | NEGATIVO       | NEGATIVO       |
| 112                        | 40 SA+ 4d | POSITIVO                               | POSITIVO | POSITIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO       | POSITIVO       |
| 126                        | 39 SA+ 2d | POSITIVO                               | POSITIVO | POSITIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO       | POSITIVO       |
| 136                        | 41 SA+ 4d | POSITIVO                               | POSITIVO | POSITIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO       | POSITIVO       |
| 137                        | 37 SA+ 6d | POSITIVO                               | POSITIVO | POSITIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO       | POSITIVO       |
| 184                        | 41 SA     | POSITIVO                               | POSITIVO | POSITIVO                    | NEGATIVO | POSITIVO       | POSITIVO       |
| Número de falsos positivos |           | 2                                      | 0        |                             |          |                |                |
| Número de falsos negativos |           | 3                                      | 5        |                             |          |                |                |

Nota SA = semana de amenorrea  
d = días

Tabla 3: tabla que comprende casos no concordantes y el análisis clínico

| N° de muestra | Opinión del obstetra | Término (semanas de amenorrea) | Comentarios   |
|---------------|----------------------|--------------------------------|---|
| 119           | NEGATIVO             | 40+2d                          | 40 semanas de amenorrea + 2 días. Parto espontáneo, cuello abierto 4 cm con bolsa de las aguas percibida, pérdidas desde hace 3 días.   |
| 163           | NEGATIVO             | 32                             | 32 semanas de amenorrea. Sospecha de pérdidas durante vómitos después de HGPO (hiperglucemia provocada por vía oral). En la ecografía, líquido amniótico normal y la paciente sale de hospitalización. Sin flujo durante 2 semanas.   |
| 112           | POSITIVO             | 40+4d                          | 40 semanas de amenorrea + 4 días flujo visible. El pH no vira.  |
| 126           | POSITIVO             | 39+2d                          | 39 semanas de amenorrea + 2 días, señala pérdidas, el pH no vira.   |
| 136           | POSITIVO             | 41+4d                          | 41 semanas de amenorrea + 4 días. La paciente señala pérdidas.  |
| 137           | POSITIVO             | 37                             | 37 semanas de amenorrea + 6 días. La paciente señala pérdidas.  |
| 115           | POSITIVO             | 34+4d                          | Flujo claro a las 34 semanas de amenorrea + 4 días con diagnóstico de oligoamnios en la ecografía. Paciente hospitalizada a pesar de una prueba de ACTIVIM® (marca registrada) PROM negativa pero la clínica está a favor de rotura de membrana. Seguimiento de pérdidas y parto espontáneo 4 días después. |
| 184           | POSITIVO             | 40 SA+5d                       | Rotura clara, flujo visible.  |

Nota SA = semana de amenorrea  
d = días

La siguiente tabla 4 resume los resultados obtenidos con el procedimiento de la invención en relación con el procedimiento del estado de la técnica.

Tabla 4:

|                                 | Procedimiento del estado de la técnica | Procedimiento de la invención (IGFBP-1 + AFP) |
|---------------------------------|--|---|
| Especificidad                   | 97,10% (67/69)                         | 100% (64/64)                                  |
| Intervalo de confianza          | 89,92 - 99,65                          | 94,4-100                                      |
| Concordancia con datos clínicos | 95,10%                                 | 94,60%  |

5 Por lo tanto, el procedimiento de la invención que comprende la detección de la IGFBP-1 y AFP, permite obtener una especificidad de 100%, permitiendo así eliminar todos los resultados falsos positivos y concluir, puesto que la AFP y la IGFBP-1 se detectan en la rotura de membranas fetales, al contrario de los dispositivos de la técnica anterior. Esto es una mejora importante ya que los resultados falsos positivos de las pruebas del estado de la técnica representan un verdadero problema para el médico y la paciente, ya que pueden generar actos médicos inútiles (toma de  
10 antibióticos, inducción del parto o llevar a una cesárea).

Además, según la invención, para las muestras para las que los resultados obtenidos eran AFP+/IGFBP1- (considerado como no determinado por el médico) se llevó a cabo una etapa complementaria de detección de IGFBP-1 con un umbral de detección de 5 ng/ml. Así se ha podido aumentar la sensibilidad de la detección de la rotura de membranas fetales como se indica en la siguiente tabla 5:

15 Tabla 5

|                                 | Procedimiento del estado de la técnica | Procedimiento de la invención (IGFBP-1 + AFP) que comprende una etapa complementaria de detección de IGFBP-1 |
|---------------------------------|--|--|
| Especificidad                   | 97,10% (67/69)                         | 100% (69/649)  |
| Intervalo de confianza          | 89,92 - 99,65                          | 94,79 -100   |
| Número de no determinados       | 0                                      | 0  |
| Concordancia con datos clínicos | 95,10%                                 | 95,10%   |

Según otro modo de realización de la invención, se ha tenido en cuenta la cinética de la AFP. En particular, la concentración en el líquido amniótico disminuye al final del embarazo. Por lo tanto, la detección o no de la AFP se ha correlacionado con la fecha de la toma de muestra. En particular, la muestra se ha clasificado en función de si se ha  
20 tomado antes o durante/después de la semana 39 de amenorrea.

La siguiente tabla 6 resume los resultados obtenidos y la fecha de la toma de muestra

|   | Falsos negativos en AFP | Falsos positivos en AFP |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Población cuyo término es inferior a 39SA         | 0                       | 5                       |
| Población cuyo término es superior o igual a 39SA | 5                       | 0                       |

Como se ha demostrado antes, en este modo de realización, la rotura se detecta con certeza con el procedimiento de la invención.

25 Además, según el modo de realización, la población ensayada para la que la prueba era AFP/IGFBP1 se dividió en dos en función de que la muestra proviniera de pacientes de término inferior a 39 semanas (subgrupo 1) o de pacientes de término superior o igual a 39 semanas (subgrupo 2). En el presente ejemplo, el subgrupo 1 corresponde a 45 pacientes entre las que no se ha puesto de manifiesto ningún falso negativo y el subgrupo 2 corresponde a 24 pacientes en las que se han detectado 5 falsos negativos. La población ensayada para la que la  
30 prueba era AFP+/IGFBP1- se dividió en función de que la muestra proviniera de pacientes de término inferior a 39 semanas (subgrupo 3) o de pacientes de término superior o igual a 39 semanas (subgrupo 4).

Como se demuestra en la siguiente tabla 7, el procedimiento de la invención permite, excluyendo las pacientes correspondientes a los subgrupos 2 y 3, detectar con una sensibilidad y especificidad de 100% la rotura o no rotura de membranas fetales. Al contrario, los procedimientos del estado de la técnica no permiten obtener dichos  
35 resultados. En particular, se obtienen falsos positivos y falsos negativos con los dispositivos conocidos, sin posibilidad de identificar subgrupos de pacientes en los que el resultado es fiable al 100%.

Tabla 7

|                                 | Procedimiento del estado de la técnica | Procedimiento de la invención (IGFBP-1 + AFP) |
|---------------------------------|--|---|
| Evaluaciones                    | 3 falsos negativos, 2 falsos positivos | 0 falsos positivos, 0 falsos negativos        |
| Sensibilidad                    | 90,91% (30/33)                         | 100% (24/24)                                  |
| Intervalo de confianza          | 75,67 - 98,08                          | 85,75- 100                                    |
| Especificidad                   | 97,10% (67/69)                         | 100% (48/48)                                  |
| Intervalo de confianza          | 89,92 - 99,65                          | 92,60-100                                     |
| Número de casos no determinados | 0                                      | 30/102 (29,4%)                                |
| Concordancia con datos clínicos | 95,10%                                 | 100,00%                                       |

Como se ha demostrado en este ejemplo, el procedimiento de la invención permite obtener un resultado fiable de la rotura o no rotura de las membranas fetales, permitiendo liberarse ventajosamente de pruebas o exámenes clínicos complementarios.

5

Lista de referencias

1. Rutanen et al. Radioimmunoassay of placenta protein 12 : levels in amniotic fluid, cord blood and serum of healthy adults, pregnant women and patients with trophoblastic disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1982
2. Rochelson et al. Rapid assay: possible application in the diagnosis of premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 1983; 62:414–418
3. Young-Han Kim et al. Vaginal fluid b-human chorionic gonadotropin level in the diagnosis of premature rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84: 802—805
4. Koninckx PR et al. Prolactin concentration in vaginal fluid: a new method for diagnosing ruptured membranes. *Br J Obstet Gynaecol* 1981;88:607–610
5. Rutanen et al, “Monoclonal antibodies to the 27-34K insulin-like growth factor binding protein” *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; 152 : 208
6. Pekonen et al, “A monoclonal antibody-based immunoradiometric assay for low molecular weight insulin-like growth factor binding protein/placental protein 12”, *J immunoassay* 1989 ; 10 : 325-337
7. Beer et al. Qualification of cellulose nitrate membranes for lateral-flow assays, *IVD technology*, enero de 2002.
8. Anne Harwood Peruski et al. Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, julio de 2003, pág.506-513
9. Rutanen et al. Measurement of Insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical/vaginal secretions : comparison with the

- ROM-Check Membrane Immunoassay in the diagnosis of ruptured fetal membranes. *Clinica Chimica Acta*, 214 (1993), 73-81
10. Rutanen et al. Decidual transformation of human extrauterine mesenchymal cells is associated with the appearance of insulin like growth factor binding protein 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992 ; 72 : 27-31
  11. Rutanen et al. Evaluation of a rapid strip test for insulin-like growth factor binding protein 1 in the diagnosis of foetal ruptured membranes. *Clinica Chimica Acta.* 253 ; (1996) 91-101
  12. Kishida et al. Diagnosis of premature rupture of the membranes in pterm patients, using an improved AFP kit : comparison with ROM-Check and/or nitrazine test. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 69 (1996) 77-82
  13. Bell C. Secretory endometrial and decidual proteins : studies and clinical significance of a maternally derived group of pregnancy associated serum proteins. *Human Reproduction.* Vol. 1-3 129-143. 1986.
  14. Nazimova et al. Blood Serum Content of PAMG-1 Protein Binding Insulin like Growth Factor 1 (Somatomedin C) in Patients with Diabetes Mellitus. *Bullet. Experim. Biol. and Med.* 166/9 septiembre de 1993

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento de detección in vitro de una rotura de membranas fetales, que comprende una etapa de búsqueda simultánea, en una muestra de secreciones vaginales o de cuello uterino, de la alfa-fetoproteína (AFP) y de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGFBP-1), procedimiento en el que se detecta una rotura de membrana fetal cuando se detecta solo la IGFBP-1 o en combinación con la AFP, la ausencia de rotura se detecta cuando no se detecta ni la IGFBP-1 ni la AFP, y cuando solo se detecta la AFP, el procedimiento comprende opcionalmente además una etapa de detección de la IGFBP-1 sola.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la búsqueda se realiza con al menos un anticuerpo de captura dirigido contra la AFP y con al menos un anticuerpo de captura dirigido contra la IGFBP-1.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la búsqueda se realiza a partir de una muestra de secreciones vaginales o de cuello uterino diluida en una solución tampón.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el procedimiento comprende el ajuste de al menos uno de los parámetros seleccionados del volumen, pH, fuerza iónica del medio tampón, siendo dicho ajuste común para la AFP y la IGFBP-1.
- 5.- Procedimiento según las reivindicaciones 3 o 4, en el que el pH de la solución tampón es de 5 a 10.
- 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que los anticuerpos de captura anti-AFP y anti-IGFBP-1 están todos en forma seca.
- 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha etapa de búsqueda comprende una etapa de revelado realizada con al menos un anticuerpo marcado anti-AFP y al menos un anticuerpo marcado anti-IGFBP-1.
- 8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el procedimiento comprende el ajuste de al menos uno de los parámetros seleccionados de la concentración de los anticuerpos de captura y/o la concentración de los anticuerpos marcados, siendo dicho ajuste específico para la AFP y la IGFBP-1.
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha IGFBP-1 se detecta a partir de una concentración de 1 a 10 ng/ml.
- 10.- Uso del dispositivo que comprende:
- a. una zona (1) de depósito de una muestra
  - b. una zona (2) que comprende anticuerpos anti-IGFBP-1 y anticuerpos anti-AFP marcados
  - c. una zona (3) de revelado que comprende anticuerpos de captura dirigidos contra la AFP y anticuerpos de captura dirigidos contra la IGFBP-1
- para llevar a cabo el procedimiento de la invención según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 11.- Uso del dispositivo según la reivindicación 10, en el que la zona de depósito (1) es o un papel absorbente o un soporte de fibra de vidrio.
- 12.- Uso del dispositivo según la reivindicación 10 u 11, en el que la zona de revelado (3) es una membrana de nitrocelulosa.
- 13.- Uso del dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la zona (2) es un soporte de fibra de vidrio.

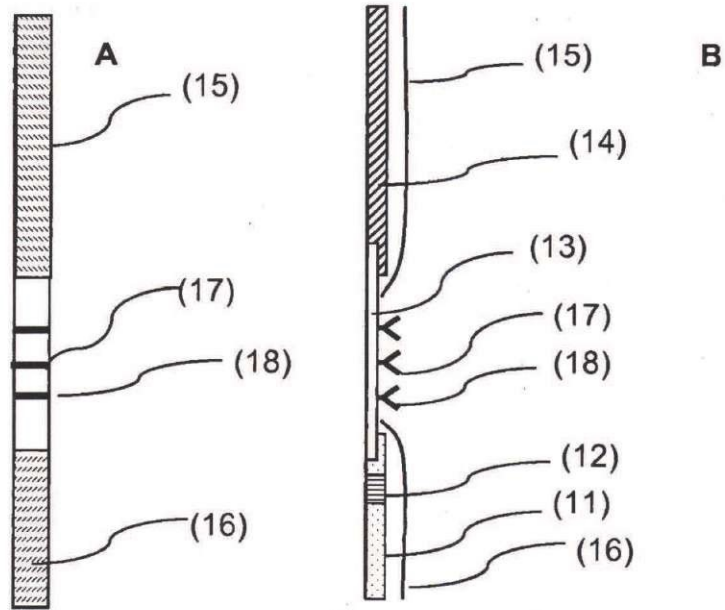


FIGURA 1

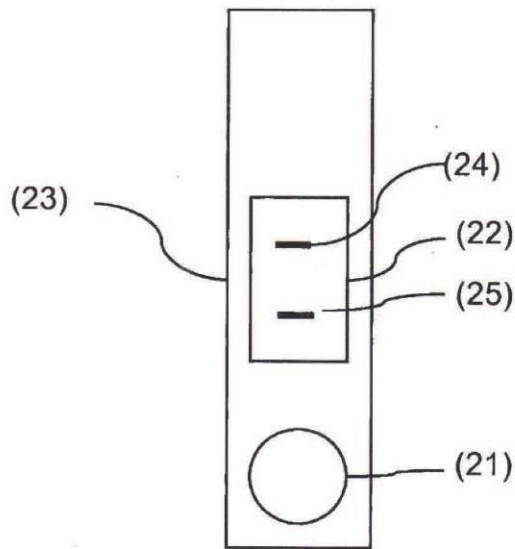


FIGURA 2