

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 471**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2015 PCT/US2015/065176**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16094761**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2015 E 15866534 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3230738**

54 Título: **Aparato de ensayo para el biomarcador cardiaco ST2**

30 Prioridad:

11.12.2014 US 201414566938

11.12.2014 US 201414566955

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2020

73 Titular/es:

**CRITICAL CARE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
Suite 117A
San Diego, CA 92109, US**

72 Inventor/es:

**SNIDER, JAMES V.;
BENDER, JILLIAN ELIZABETH;
KUO, SHRIN P. y
CHUNG, ROY A.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 773 471 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

Aparato de ensayo para el biomarcador cardiaco ST2

Reivindicación de prioridad

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud del documento de utilidad de Estados Unidos 14/566.938, presentada el 11 de diciembre de 2014, y la solicitud de del documento de utilidad de Estados Unidos 14/566.955, presentada el 11 de diciembre de 2014.

Campo técnico

La invención se refiere a la detección de la presencia de biomarcadores cardiacos en la sangre.

Antecedentes

10 Los biomarcadores que indican la probabilidad de que un sujeto padezca una afección relacionada con su salud correspondiente potencia significativamente la capacidad del médico de tomar decisiones de tratamiento con información.

15 Tominaga, FEBS Lett. 258:301-304 (1989), describe el aislamiento de genes murinos que se expresaban específicamente mediante la estimulación del crecimiento en células BALB/c-3T3; denominaron uno de estos genes "St2" (para gen 2 expresado por estimulación del crecimiento). El gen St2 codifica dos productos proteínicos: ST2, que es una forma secretada soluble; y ST2L, una forma de receptor transmembranario que es muy similar a los receptores de interleucina-1. El comité de nomenclatura HUGO designó el homólogo humano, cuya clonación se describió en Tominaga y col., Biochim. Biophys. Acta. 1171:215-218 (1992), como el receptor de tipo 1 de interleucina 1 (IL1RL1). Los dos términos se usan indistintamente en el presente documento.

20 El gen ST2 es un miembro de la familia de receptores de interleucina-1, cuyo producto proteínico existe tanto como una forma transmembranaria, y también como receptor soluble que es detectable en suero (Kieser y col., FEBS Lett. 372(2-3):189-93 (1995); Kumar y col., J. Biol. Chem. 270(46):27905-13 (1995); Yanagisawa y col., FEBS Lett. 302(1):51-3 (1992); Kuroiwa y col., Hybridoma 19(2):151-9 (2000)). ST2 se describió regulado por aumento notablemente en un modelo experimental de insuficiencia cardiaca (Weinberg y col., Circulation 106(23):2961-6 (2002)) y esta observación se validó en un trabajo más reciente publicado por Pascual-Figal, y col., (2014). El análisis de cortes de estudio clínico muestra que las concentraciones de ST2 pueden elevarse en aquellos con insuficiencia cardiaca (HF) grave crónica (Weinberg y col., Circulation 107(5):721-6 (2003)), así como en aquellos con infarto de miocardio (MI) agudo (Shimpo y col., Circulation 109(18):2186-90 (2004)) y que esta concentración elevada es clínicamente significativa.

30 Se cree que la forma transmembranaria de ST2 desempeña una función en la modulación de las respuestas de linfocitos T auxiliares de tipo 2 (Lohning y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A., 95(12):6930-5 (1998); Schmitz y col., Immunity 23(5):479-90 (2005)) y pueden desempeñar una función en el desarrollo de tolerancia en estados de inflamación grave o crónica (Brint y col., Nat. Immunol. 5(4):373-9 (2004)), mientras que la forma soluble de ST2 está regulada por aumento en fibroblastos estimulados por el crecimiento (Yanagisawa y col., 1992, supra). Los datos experimentales sugieren que el gen ST2 está notablemente regulado por aumento en estados de dilatación de miocitos (Weinberg y col., 2002, supra) de una manera análoga a la inducción del gen BNP (Bruneau y col., Cardiovasc. Res. 28(10):1519-25 (1994)) y se ha demostrado que está implicado en el proceso de remodelado cardiaco (Sanada, 2007; Seki, 2009).

40 El documento US 2007/020768 describe dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral de dos etapas y procedimientos para identificar anticuerpos IgE en una muestra.

45 El documento US 2002/146346 describe un sistema y procedimiento para la detección de diversas drogas en líquidos corporales. El líquido corporal se recoge mediante un extremo de recogida del dispositivo, una serie de cabezales de presión dentro del tapón del dispositivo recolector impulsa la muestra, según el extremo recolector del dispositivo pasa a través de los cabezales de presión, al centro de un sistema de inmunoensayo que contiene tiras de diagnóstico para la detección de estupefacientes.

El documento US 2009/286692 describe un cartucho que contiene una matriz direccionable para detectar la presencia de uno o más analitos diana en una muestra de líquido.

50 El documento US 6.867.051 describe sistemas y procedimientos para el diagnóstico médico o la evaluación de riesgos para un paciente, que procesa ensayos de diagnóstico o datos de ensayo y proporciona una indicación de una afección médica o riesgo o ausencia del mismo.

El documento EP 1 033 575 describe un dispositivo de ensayo para medir más de un analito en una muestra. Una tira reactiva se coloca en una carcasa que forma una barrera impermeable a líquidos para controlar el flujo del líquido de muestra.

El documento EP 1 186 889 describe un alojamiento para un aparato de inmunocromatografía que puede detectar la concentración de un analito contenido en una muestra.

El documento US 2012/282634 describe una capa de tira reactiva seca para filtrar eritrocitos, que incluye una capa de fibra de vidrio de borosilicato y lectina.

5 **Sumario**

La presente invención proporciona un aparato de ensayo que comprende una tira reactiva y un alojamiento, como se expone en la reivindicación independiente 1. Se describen características adicionales del alojamiento en las reivindicaciones dependientes. La invención proporciona además un sistema de ensayo para el biomarcador cardiaco ST2, que comprende una tira reactiva para detectar un nivel umbral de ST2 en plasma sanguíneo, y un alojamiento, como se describe en la reivindicación independiente 8. Se describen características adicionales de la tira reactiva de ST2 en las reivindicaciones dependientes.

Esta divulgación describe kits de ensayo y aparato para detectar si un nivel de ST2 presente en un sujeto humano excede un estado umbral. Las tiras reactivas incluyen múltiples anticuerpos que interactúan con otro o con el ST2 si está presente en una muestra, por ejemplo, una muestra de sangre, para proporcionar una indicación del nivel de ST2 en la muestra. El flujo de la muestra dentro de las tiras reactivas cuenta con la asistencia de un tampón formulado adecuadamente. Las tiras reactivas se disponen dentro de alojamientos diseñados especialmente para formar casetes, cuyo interior está configurado para crear un soporte consistente de la tira que ayuda al flujo de la muestra y el tampón a lo largo de la tira reactiva.

En un aspecto, el presente documento plasma tiras reactivas para su uso en la medición de un nivel de un biomarcador cardiaco ST2 en una muestra de plasma sanguíneo. Las tiras reactivas incluyen una base y una pluralidad de conjugados, en las que cada conjugado incluye un grupo indicador unido a un primer anticuerpo se une a ST2. Cada tira reactiva incluye además una almohadilla de conjugado dispuesta a lo largo de una longitud de la base y configurada para alojar la pluralidad de conjugados que se unen con ST2 para producir complejos de conjugado-ST2, en la que la almohadilla de conjugado está configurada además para recibir la muestra de plasma sanguíneo. La tira reactiva también incluye una pluralidad de segundos anticuerpos que se unen a ST2, y una pluralidad de terceros anticuerpos que se unen a los complejos de conjugado-ST2. Hay una membrana dispuesta en la base de modo que la membrana esté en comunicación fluida con la almohadilla de conjugado. La pluralidad de segundos anticuerpos se une a la membrana en una ubicación de ensayo y la pluralidad de terceros anticuerpos se une a la membrana en una ubicación de control dispuesta más lejos de la almohadilla de conjugado que la ubicación de ensayo.

En otro aspecto, el presente documento plasma dispositivos de ensayo que incluyen una tira reactiva que tiene un primer extremo y un segundo extremo opuesto, y un alojamiento para la tira reactiva y una etiqueta de identificación de radiofrecuencia (RFID) configurada para almacenar información asociada con la tira reactiva, una primera sección y una segunda sección. La primera sección incluye una cara exterior y una cara interior, en la que la cara interior de la primera sección comprende un canal para recibir la tira reactiva a lo largo de la longitud de la primera sección. La sección incluye una cara exterior y una cara interior, en la que la segunda sección está configurada para fijarse a la primera sección de modo que en una configuración fijada la cara interior de la primera sección esté enfocada a la cara interior de la segunda sección, y la primera y segunda sección conjuntamente encierran la etiqueta RFID y la tira reactiva dentro del alojamiento. La segunda sección incluye un acceso de tampón configurado para permitir que una solución de tampón se distribuya a una parte de la tira reactiva próxima a un primer extremo de la tira reactiva, una ventana de ensayo configurada para facilitar las imágenes de una o ambas de una ubicación de ensayo y una ubicación de control en la tira reactiva y un acceso de muestra dispuesto entre el acceso de tampón y la ventana de ensayo. El acceso de muestra está configurado para posibilitar que una muestra de plasma sanguíneo se distribuya en la tira reactiva. La segunda sección también incluye un conjunto de proyecciones dispuesto sobre la cara interior de la segunda sección entre la ventana de ensayo y el acceso de muestra de modo que, en la configuración fijada, en la que cada proyección en el conjunto de proyecciones está en contacto con la tira reactiva. Una altura de al menos una proyección en el conjunto de proyecciones es diferente de una altura de otra proyección en el conjunto de proyecciones, y las alturas de las diferentes proyecciones están configuradas de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produce un gradiente de presión que permite que un líquido fluya a un caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva entre la primera y la última proyección en el conjunto de proyecciones.

En otro aspecto, el presente documento plasma sistemas de ensayo para el biomarcador cardiaco ST2. Los sistemas de ensayo incluyen una tira reactiva, un alojamiento para la tira reactiva, una etiqueta de identificación y un dispositivo lector. La tira reactiva está configurada para facilitar la detección de un nivel umbral de ST2 en plasma sanguíneo. El alojamiento incluye una primera sección que incluye una cara exterior y una cara interior, en la que la cara interior de la primera sección incluye un canal para recibir la tira reactiva a lo largo de la longitud de la primera sección. La sección incluye una cara exterior y una cara interior, en la que la segunda sección está configurada para fijarse a la primera sección de modo que, en una configuración fijada, la cara interior de la primera sección esté enfocada a la cara interior de la segunda sección. La primera y segunda sección conjuntamente encierran la tira reactiva dentro del alojamiento. La segunda sección incluye un acceso de tampón configurado para permitir que una solución de tampón se distribuya a una parte de la tira reactiva próxima a un primer extremo de la tira reactiva, una ventana de ensayo configurada para

facilitar las imágenes de una o ambas de una ubicación de ensayo y una ubicación de control en la tira reactiva y un acceso de muestra dispuesto entre el acceso de tampón y la ventana de ensayo. El acceso de muestra está configurado para posibilitar que una muestra de plasma sanguíneo se distribuya en la tira reactiva. La segunda sección también incluye un conjunto de proyecciones dispuesto sobre la cara interior de la segunda sección entre la ventana de ensayo y el acceso de muestra de modo que, en la configuración fijada, cada proyección en el conjunto de proyecciones está en contacto con la tira reactiva. Una altura de al menos una proyección en el conjunto de proyecciones es diferente de una altura de otra proyección en el conjunto de proyecciones, y las alturas de las diferentes proyecciones están configuradas de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produce un gradiente de presión que permite que un líquido fluya a un caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva entre la primera y la última proyección en el conjunto de proyecciones. El dispositivo lector está configurado para aceptar al menos una parte del alojamiento dentro del lector. La etiqueta de identificación está dispuesta en o dentro del alojamiento, en la que la etiqueta de identificación está configurada para almacenar información asociada con la tira reactiva. El dispositivo lector incluye un sistema óptico que toma imágenes de una o ambas de la ubicación de ensayo y la ubicación de control en la tira reactiva, y presenta un nivel estimado de ST2 en la muestra de plasma sanguíneo.

En un aspecto, el presente documento plasma tiras reactivas para su uso en la medición de un nivel de un biomarcador cardíaco ST2 en una muestra de sangre completa. Las tiras reactivas incluyen una base y una pluralidad de conjugados, en las que cada conjugado incluye un grupo indicador unido a un primer anticuerpo se une a ST2. Cada tira reactiva incluye además una almohadilla de conjugado dispuesta a lo largo de una longitud de la base, estando configurada la almohadilla de conjugado para alojar la pluralidad de conjugados que se unen con ST2 para producir complejos de conjugado-ST2. La tira reactiva también incluye una pluralidad de segundos anticuerpos que se unen a ST2, y una pluralidad de terceros anticuerpos que se unen a los complejos de conjugado-ST2. Hay una membrana dispuesta en la base de modo que la membrana esté en comunicación fluida con la almohadilla de conjugado. La pluralidad de segundos anticuerpos se une a la membrana en una ubicación de ensayo y la pluralidad de terceros anticuerpos se une a la membrana en una ubicación de control dispuesta más lejos de la almohadilla de conjugado que la ubicación de ensayo. La tira reactiva incluye además una almohadilla de separación de plasma en comunicación fluida con una parte de la almohadilla de conjugado. La almohadilla de separación de plasma está dispuesta y configurada para recibir la muestra de sangre completa y para pasar plasma sanguíneo desde la muestra de sangre completa hasta la almohadilla de conjugado mientras impide el paso de otros componentes de la muestra de sangre completa a la almohadilla de conjugado.

En otro aspecto, el presente documento describe dispositivos de ensayo que incluyen una tira reactiva que tiene un primer extremo y un segundo externo opuesto, y un alojamiento para la tira reactiva que incluye una primera sección que tiene una cara exterior y una cara interior, y una segunda sección. La cara interior de la primera sección incluye un canal para recibir la tira reactiva a lo largo de la longitud de la primera sección. La sección incluye una cara exterior y una cara interior, en la que la segunda sección está configurada para fijarse a la primera sección de modo que en una configuración fijada la cara interior de la primera sección esté enfocada a la cara interior de la segunda sección, y la primera y segunda sección conjuntamente encierran la tira reactiva dentro del alojamiento. La segunda sección incluye un acceso de tampón configurado para permitir que una solución de tampón se distribuya a una parte de la tira reactiva próxima al primer extremo de la tira reactiva, una ventana de ensayo configurada para proporcionar visualización de una o ambas de una ubicación de ensayo y una ubicación de control en la tira reactiva y un acceso de muestra dispuesto entre el acceso de tampón y la ventana de ensayo. El acceso de muestra está configurado para posibilitar que una muestra de sangre completa se distribuya en la tira reactiva. La segunda sección también incluye un conjunto de proyecciones dispuesto sobre la cara interior de la segunda sección entre la ventana de ensayo y el acceso de muestra de modo que, en la configuración fijada, cada proyección en el conjunto de proyecciones está en contacto con la tira reactiva. Una altura de al menos una proyección en el conjunto de proyecciones es diferente de una altura de otra proyección en el conjunto de proyecciones, y las alturas de las diferentes proyecciones están configuradas de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produce un gradiente de presión que permite que un líquido fluya a un caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva entre la primera y la última proyección en el conjunto de proyecciones.

Implementaciones de los aspectos anteriores pueden incluir uno o más de los siguientes.

Cualquiera del primer o segundo anticuerpo o ambos pueden unirse específicamente a ST2. La tira reactiva puede incluir una almohadilla absorbente dispuesta en la base y en comunicación fluida con la membrana en un extremo o lateral de la membrana opuesta a la almohadilla de conjugado. La almohadilla absorbente puede configurarse para absorber plasma y tampón que ha atravesado a través de la membrana. La almohadilla de conjugado puede estar dispuesta en la base para recibir una solución de tampón. La almohadilla de conjugado puede incluir fibras de vidrio y/o poliéster. Al menos una de la almohadilla de separación de plasma o de la membrana puede incluir nitrocelulosa. Los primeros anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales. El grupo indicador puede incluir restos fluorescentes. Los anticuerpos monoclonales pueden incluir anticuerpos monoclonales 7E4 antiST2 que están conjugados a restos fluorescentes. Los segundos anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales 9F8 antiST2. Los terceros anticuerpos pueden incluir anticuerpos de cabra antiIgG de ratón. Los segundos anticuerpos pueden cambiar de aspecto dependiendo de la cantidad de conjugado unido presente en el plasma sanguíneo que atraviesa la primera parte.

El caudal predeterminado puede ser de modo que el líquido fluya desde la parte de la tira reactiva adyacente al acceso de tampón de la segunda sección hasta la parte de la tira reactiva adyacente a la ventana de ensayo de la segunda sección en aproximadamente 20 minutos. El conjunto de proyecciones puede ser un conjunto de salientes. Las distancias entre los salientes pueden ser sustancialmente iguales. El conjunto de proyecciones puede incluir cuatro salientes. Un primer saliente puede estar dispuesto más cerca del acceso de muestra que los otros salientes, un cuarto saliente puede estar dispuesto más cerca de la ventana de ensayo que los otros salientes, y un segundo saliente y un tercer saliente pueden estar dispuestos entre el primer y el tercer saliente. La primera sección puede incluir múltiples proyecciones de fijación que están configuradas para fijarse a los correspondientes receptáculos de fijación dispuestos en la segunda sección, en la que las dimensiones de las proyecciones de fijación y los receptáculos de fijación están configurados de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produzca el gradiente de presión que permita que el líquido fluya al caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva. El dispositivo lector puede estar configurado para consultar la etiqueta de identificación para obtener al menos una parte de la información almacenada.

Cualquiera del primer o segundo anticuerpo o ambos pueden unirse específicamente a ST2. La tira reactiva puede incluir una almohadilla absorbente dispuesta en la base y en comunicación fluida con la membrana en un extremo o lateral de la membrana opuesto a la almohadilla de conjugado, en la que la almohadilla absorbente está configurada para absorber plasma y tampón que ha atravesado a través de la membrana. La almohadilla de conjugado puede estar dispuesta en la base para recibir una solución de tampón, y una parte de la almohadilla de conjugado que recibe la solución de tampón puede no estar en contacto con la almohadilla de separación de plasma. La almohadilla de conjugado puede incluir fibras de vidrio y/o poliéster. Al menos una de la almohadilla de separación de plasma o de la membrana puede incluir nitrocelulosa. Los primeros anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. El grupo indicador puede incluir partículas de oro. Los anticuerpos monoclonales pueden incluir anticuerpos monoclonales 7E4 antiST2 que están conjugados a oro coloidal. Los segundos anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales 9F8 antiST2. Los terceros anticuerpos pueden incluir anticuerpos de cabra antiIgG de ratón. Una cantidad de cambios en un aspecto visual de una primera parte que incluye los segundos anticuerpos puede depender de una cantidad del conjugado unido presente en el plasma sanguíneo que atraviesa la primera parte.

El caudal predeterminado puede ser de modo que el líquido fluya desde la parte de la tira reactiva adyacente al acceso de tampón de la segunda sección hasta la parte de la tira reactiva adyacente a la ventana de ensayo de la segunda sección en aproximadamente 15 minutos. El conjunto de proyecciones puede ser un conjunto de salientes. Las distancias entre los salientes pueden ser sustancialmente iguales. El conjunto de proyecciones puede incluir tres salientes. Un primer saliente puede estar dispuesto más cerca del acceso de muestra que los otros salientes, un tercer saliente puede estar dispuesto más cerca de la ventana de ensayo que los otros salientes, y un segundo saliente puede estar dispuesto entre el primer y el tercer saliente. La primera sección puede incluir múltiples proyecciones de fijación que están configuradas para fijarse a los correspondientes receptáculos de fijación dispuestos en la segunda sección, en la que las dimensiones de las proyecciones de fijación y los receptáculos de fijación están configurados de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produzca el gradiente de presión que permita que el líquido de muestra fluya al caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva. La cara interior de la segunda sección puede incluir una segunda proyección alrededor del acceso de muestra, estando configurada la segunda proyección para impedir un flujo de componentes de la muestra de sangre completa a lo largo de la longitud o anchura de la tira reactiva.

Las tecnologías descritas en el presente documento proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, los nuevos procedimientos y dispositivos pueden usarse para determinar si un paciente debe admitirse o mantenerse como paciente hospitalario para evaluación adicional, independientemente de si se ha hecho un diagnóstico definitivo. Puede facilitarse la estratificación de riesgos basada en el nivel de ST2 de un sujeto dado, por ejemplo, para tomar decisiones con respecto al nivel de agresividad del tratamiento que es apropiado para el sujeto. Pueden tomarse mejores decisiones de tratamiento, que a su vez pueden dar lugar a morbilidad y mortalidad reducidas, y mejor asignación de los recursos de asistencia sanitaria.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Se describen en el presente documento procedimientos y materiales para su uso en la presente invención; también pueden usarse otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las fig. 1A y 1B son vistas superiores y en perspectiva de un ejemplo de un aparato de detección de ST2.

Las fig. 2A-2E son esquemas de los detalles de construcción de una parte superior del aparato de detección de ST2 de la fig. 1.

Las fig. 3A-3C son esquemas de los detalles de construcción de una parte inferior del aparato de detección de ST2 de la fig. 1.

La fig. 4A es un esquema que muestra un ejemplo de una tira reactiva de ST2 colocada en la parte inferior del aparato de detección de ST2 de la fig. 1.

Las fig. 4B y 4C son esquemas que muestran los detalles de construcción de dos ejemplos de una tira reactiva.

La fig. 5A es una foto que ilustra la aplicación de una muestra de sangre al aparato de la fig. 1.

5 La fig. 5B es una foto que ilustra la aplicación de una solución de tampón al aparato de la fig. 1.

Las fig. 6A-6C son fotos que muestran ejemplos de los resultados de ensayo.

Las fig. 7A-7C muestran ejemplos de un dispositivo lector usado en el análisis de los resultados de ensayo usando tiras reactivas de ST2.

10 Las fig. 8A, 8B y 9 muestran los resultados de ensayos realizados usando ejemplos particulares de ensayos descritos en el presente documento.

Descripción detallada

15 La evaluación clínica de los pacientes, particularmente pacientes con síntomas no específicos tales como disnea o dolor torácico, a menudo es problemática. El biomarcador cardiaco ST2 puede usarse en la evaluación pronóstica de pacientes, independientemente de la causa subyacente de su enfermedad. En algunos casos, el nivel de ST2 en la sangre puede ser un potente indicador de salud cardiaca, y dicha información puede usarse al tomar las medidas para prevenir la aparición de afecciones agudas o incluso la muerte. El aparato de ensayo de ST2 descrito en el presente documento permite una detección rápida y fiable de los niveles de ST2 en la sangre, que a su vez puede usarse por los médicos y profesionales clínicos para determinar el mejor plan de tratamiento para el paciente.

20 La secuencia de ARNm de la isoforma soluble más corta de ST2 humano puede encontrarse en el n.º de acceso a GenBank NM_003856.2, y la secuencia polipeptídica está en el n.º de acceso a GenBank NP_003847.2; la secuencia de ARNm para la forma más larga de ST2 humano está en el n.º de acceso a GenBank NM_016232.4; la secuencia polipeptídica está en el n.º de acceso a GenBank NP_057316.3. Hay información adicional disponible en las bases de datos públicas en GenEID: 9173, MIM ID n.º 601203 y UniGene n.º Hs.66. En general, los procedimientos, dispositivos y sistemas descritos en el presente documento miden la forma soluble del polipéptido ST2.

25 Las fig. 1A y 1B muestran vistas superiores y en perspectiva de un ejemplo de un aparato de detección 100 de ST2. En algunas implementaciones, el aparato 100 incluye una parte superior 105 que está fijada a una parte inferior 110. La parte superior 105 y la parte inferior 110 forman conjuntamente un alojamiento (también denominado casete) dentro del que se distribuye una tira reactiva de detección de ST2. En algunas implementaciones, la parte superior 105 incluye una ventana de ensayo 115. La ventana de ensayo 115 es una abertura u orificio en la parte superior 105 que expone una parte de la tira reactiva dispuesta en el alojamiento. La parte de la tira reactiva expuesta por la ventana de ensayo 30 115 incluye una o más ubicaciones marcadoras que cambian de aspecto durante el ensayo de detección de ST2. Por ejemplo, las ubicaciones marcadoras pueden incluir una línea de control (una ubicación de la cual puede marcarse por la letra "C") que indica que un ensayo se ha realizado apropiadamente, y una línea de ensayo (una ubicación de la cual puede estar marcada por la letra "T") que llega a ser visible si un biomarcador particular (por ejemplo, ST2) está presente en el analito. La forma y dimensiones de la ventana de ensayo 115 pueden configurarse de modo que cada 35 una de las ubicaciones marcadoras sea visible a través de la ventana de ensayo 115.

40 La parte superior 105 también incluye un acceso de muestra 120 a través del que se distribuye el analito (por ejemplo, sangre u otro líquido corporal) al aparato 100. El acceso de muestra 105 es una abertura u orificio en la parte superior 105 que permite que el analito se distribuya sobre la parte de recepción de muestra de la tira reactiva dispuesta en el alojamiento. La forma y dimensiones del acceso de muestra se configuran de acuerdo con la parte de recepción de muestra de la tira reactiva. En algunas implementaciones, el acceso de muestra 120 incluye una pared lateral 122 que puede formar un sellamiento con la parte de recepción de muestra de la tira reactiva. En dicha configuración de sellamiento, la pared lateral 122 impide el flujo lateral de una muestra distribuida en el acceso de muestra 120 a lo largo de la parte superior de la tira reactiva.

45 La parte superior también incluye un acceso de tampón 125 a través del que puede distribuirse una solución de tampón al aparato 100. La solución de tampón fluye a través de la tira reactiva, por ejemplo, mediante acción capilar, desde la ubicación por debajo del acceso de tampón 125 en la dirección de la ventana de ensayo 115. Según fluye la solución de tampón a lo largo dentro de la tira reactiva, la solución proporciona movilidad al plasma de la muestra de sangre de modo que el plasma también fluye a lo largo dentro de la tira reactiva desde la ubicación por debajo del acceso de muestra 120 hacia la ventana de ensayo 115. Según fluye el plasma pasada la parte de la tira reactiva expuesta por la ventana de ensayo 115, una o más de las ubicaciones marcadoras (por ejemplo, la línea de ensayo y la línea de control) pueden cambiar en su aspecto visual dependiendo del nivel de ST2, si lo hay, en el plasma. Por ejemplo, si el nivel de ST2 en el plasma está por encima de un nivel umbral, las ubicaciones marcadoras correspondientes tanto a la línea de ensayo como a la línea de control cambian de aspecto y ambas líneas llegan a ser visibles. Por otro lado, 50 si el nivel de ST2 en el plasma está por debajo del nivel umbral, únicamente la ubicación marcadora correspondiente a la línea de control cambia de aspecto y, por tanto, la línea de control (y no la línea de ensayo) llega a ser visible. La ausencia de una línea de control puede indicar que el plasma no ha fluido a través de la tira reactiva todo el trayecto hasta la línea de control, y el ensayo es inválido.

60 En algunas implementaciones, en lugar de (o además de) una determinación visual, el nivel de ST2 en el plasma puede medirse cuantitativamente. En tales casos, el alojamiento o casete puede configurarse para insertarse en un

dispositivo lector (por ejemplo, el dispositivo lector descrito a continuación con referencia a las fig. 7A y 7B) que analiza la tira reactiva y proporciona una medida cuantitativa del nivel de ST2 en el plasma. En algunas implementaciones, el lector analiza la tira reactiva a través de la ventana de ensayo 115 (por ejemplo, obteniendo una imagen de la parte de la tira reactiva expuesta a la ventana de ensayo 115). En algunas implementaciones, los casetes que se insertan en un lector pueden incluir una abertura a través de la que puede extraerse la tira reactiva desde el casete por el lector para el análisis.

En algunas implementaciones, el nivel de ST2 puede realizarse, por ejemplo, analizando una imagen de la línea de ensayo y la línea de control. En algunas implementaciones, dicho análisis de imágenes puede realizarse, por ejemplo, usando una aplicación instalada en un dispositivo informático tal como un ordenador portátil o de escritorio o un dispositivo móvil tal como un teléfono inteligente o tableta. En algunas implementaciones, un usuario puede ser capaz de capturar una imagen de la línea de ensayo y la línea de control usando, por ejemplo, una cámara de un dispositivo móvil. La imagen capturada entonces puede analizarse, por ejemplo, usando una aplicación instalada en el dispositivo móvil. En algunos casos, la imagen capturada también puede analizarse proporcionando la imagen a un dispositivo informático remoto que ejecuta una aplicación adecuada de análisis de imágenes.

En algunas implementaciones, la parte superior 105 incluye una parte designada para marcar el casete con información de identificación relacionada con el sujeto o paciente correspondiente. En algunas implementaciones, el alojamiento o casete también puede incluir un módulo de identificación automático tal como una etiqueta de identificación por radiofrecuencia (RFID) codificada con la información de identificación relacionada con la muestra o paciente correspondiente. En tales casos, el lector incluye un módulo adecuado para consultar y recuperar información del módulo de identificación automático. Por ejemplo, si el casete incluye una etiqueta RFID, la unidad receptora puede configurarse para incluir un lector de RFID para extraer información de la etiqueta. También pueden usarse otras tecnologías de comunicación adecuadas tales como comunicaciones de campo cercano (NFC) o Bluetooth® en lugar de RFID.

Las fig. 2A-2E muestran los detalles de construcción de una implementación particular de la parte superior 105. La fig. 2A muestra la cara exterior 130 de la parte superior 105 y la fig. 2B muestra la cara interior 135 de la parte superior 105. En algunas implementaciones, la cara interior 135 (que está enfocada a la cara interior de la parte inferior 110) puede incluir múltiples proyecciones de combinación 150 que están configuradas para acoplar con los receptáculos correspondientes en la parte inferior 110. El ejemplo de la fig. 2B muestra seis de dichas proyecciones de combinación 150. Otras implementaciones pueden tener un número diferentes de dichas proyecciones de combinación 150. Las proyecciones de combinación se acoplan con los receptáculos correspondientes en la parte inferior 110 de modo que la parte superior e inferior conjuntamente forman un alojamiento o casete sustancialmente sellado en que se dispone la tira reactiva. Por esta razón, las proyecciones de combinación 150 pueden denominarse proyecciones de fijación, y los receptáculos correspondientes pueden denominarse receptáculos de fijación.

En algunas implementaciones, la cara interior 135 de la parte superior 105 incluye múltiples proyecciones 152a, 152b y 152c (152, en general). En algunas implementaciones, las proyecciones pueden estar en forma de salientes. Las dimensiones de las proyecciones 152 son diferentes entre sí, y están configuradas de acuerdo con el grosor variable de la tira reactiva alojada dentro del casete. En algunas implementaciones, la tira reactiva es más gruesa en la parte que entra en contacto con la proyección 152a que las partes que entran en contacto con las partes 152b y 152c, respectivamente. Por consiguiente, la altura de las proyecciones 152 desde la cara interior 135 puede ajustarse de modo que la proyección 152a sea más corta que la proyección 152b, y la proyección 152b es más corta que la proyección 152c. La altura respectiva de cada proyección 152 está configurada de modo que cuando la parte superior 105 se acople con la parte inferior 110 para formar un casete, cada una de las proyecciones 152 esté en contacto con la tira reactiva alojada dentro del casete. Además, el conjunto de proyecciones 152 está configurado de modo que produce un gradiente de presión dentro de la tira reactiva para permitir que un líquido de muestra fluya a un caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva entre la proyección 152a y la proyección 152c. En algunas implementaciones, el conjunto de proyecciones 152 puede configurarse para sostener la tira reactiva sin crear un punto de presión que impida el caudal a lo largo de la longitud de la tira reactiva. En algunas implementaciones, las proyecciones pueden medirse con respecto a una medida inicial tal como la línea 153. En el ejemplo de la fig. 2E, las alturas de las proyecciones 152a, 152b y 152c son 0,003 unidades, 0,011 unidades y 0,027 unidades, respectivamente. El caudal también puede configurarse, por ejemplo, variando diversos parámetros de la tira reactiva incluyendo, por ejemplo, la composición de conjugados dispuesta en la tira reactiva.

También son posibles otras variaciones de la parte superior. Las fig. 2C y 2D muestran la vista lateral y la cara interior 136, respectivamente, de un ejemplo de dicha variación 106. La parte superior 106 mostrada en las fig. 2C y 2D, puede usarse, por ejemplo, en una implementación donde el casete se usa junto con un dispositivo lector tal como el descrito a continuación con referencia a las fig. 7A-7C. En algunas implementaciones, donde el casete se usa junto con un dispositivo lector, puede usarse plasma (y no sangre completa) como biomuestra o muestra de ensayo, y la dinámica de flujo puede ser diferente de las implementaciones que usan sangre completa como muestra. Por consiguiente, el acceso de muestra 121 de la parte superior 106 (fig. 2D) puede hacerse más pequeño que el acceso de muestra 120 de la parte superior 105 (fig. 2B), donde puede necesitarse un acceso más grande para facilitar un flujo apropiado para separar el plasma de la muestra de sangre completa.

En algunas implementaciones, la parte superior 105 y la parte inferior 110 también encierran una etiqueta de

identificación (tal como una etiqueta de identificación de radiofrecuencia (RFID)) que incluye información de identificación acerca de un paciente y/o muestra correspondiente. En dichos casos, la parte superior 105 puede tener una parte particular 151 configurada para recibir la etiqueta de identificación. En algunas implementaciones, la información de identificación también puede estar codificada, por ejemplo, como un código de barras o código de reconocimiento rápido (QR), e impresa sobre una cara exterior de la parte superior o la parte inferior. La etiqueta de identificación o código puede inspeccionarse o detectarse por un lector apropiado para determinar automáticamente la información de identificación relacionada con un paciente o muestra.

La fig. 2E muestra una vista en sección transversal de la parte superior 105, junto con una vista ampliada de las proyecciones 152. Como se muestra en la fig. 2E, la altura de la proyección 152b es mayor que la de las proyecciones 152a, y la altura de la proyección 152c es mayor que la de las proyecciones 152b. En el ejemplo mostrado en la fig. 2E, para conseguir el gradiente de presión deseado dentro de una tira reactiva en el casete, una proporción de las alturas de las proyecciones 152a, 152b y 152c desde un nivel de referencia 155 es 3:11:27. En algunas implementaciones, la tira reactiva dispuesta dentro del casete puede tener un intervalo limitado de tolerancia de presión frente a fugas. Por ejemplo, si el ajuste es demasiado apretado, partes de la tira reactiva pueden aplastarse provocando de ese modo fugas del líquido de ensayo de la tira. Por otro lado, si el ajuste es demasiado holgado, también puede haber fugas. En algunas implementaciones, las alturas de las proyecciones 152a, 152b y 152c pueden configurarse de modo que la tira reactiva se mantenga dentro del casete sin traspasar el intervalo de tolerancia de presión correspondiente. Esto puede evitar las fugas de la tira reactiva dispuesta dentro del casete.

Las fig. 3A-3C muestran los detalles de construcción de la parte inferior 110 del aparato 100. La fig. 3A muestra una vista en perspectiva en que la cara interior 160 de la parte inferior es visible. Cuando la parte inferior 110 se fija a la parte superior 105, la cara interior 160 está enfocada a la cara interior 135 de la parte superior 105. Como se muestra en la fig. 3C, la cara exterior 165 está en la superficie opuesta de la parte inferior 110, y no es visible en la vista mostrada en la fig. 3A. La cara interior 160 incluye múltiples receptáculos 175 que están configurados para acoplar con las proyecciones de combinación 150 dispuestas en la cara interior 135 de la parte superior para formar el casete que aloja la tira reactiva. En algunas implementaciones, los receptáculos 175 son circulares y los diámetros interiores de los receptáculos 175 son marginalmente más pequeños que los diámetros de las proyecciones de combinación 150. En el ejemplo mostrado, el diámetro interior de los receptáculos es de 0,047 unidades, mientras que el diámetro de las proyecciones de combinación es de 0,05 unidades (véase la fig. 2B). Esto permite un acoplamiento fuerte entre las proyecciones de combinación y los receptáculos correspondientes.

Como se muestra en la fig. 3B, la cara interior 160 incluye un primer canal 177 y un segundo canal 178 que juntos mantienen la tira reactiva dentro del casete. En algunas implementaciones, el primer canal 177 incluye una parte elevada 179 que tiene un surco 180 que forma una configuración de sellamiento con el acceso de tampón 125 de la parte superior 105. En algunas implementaciones, la cara interior 160 de la parte inferior 110 también puede configurarse para que incluya una o más partes de soporte para sostener la tira reactiva. Por ejemplo, la cara interior 160 de la parte inferior 110 puede incluir uno o más plataformas de soporte 182. En algunas implementaciones, el primer canal 177 y/o el segundo canal 178 pueden configurarse para incluir una o más proyecciones de soporte (por ejemplo, la proyección de soporte 185 en el primer canal 177) para sostener la tira reactiva. La parte inferior 110 también puede incluir una empuñadura 186 para sujetar el casete. En algunas implementaciones, la empuñadura 186 puede estar corrugado para reducir la posibilidad de que el casete se deslice de la mano de una persona.

La fig. 4A muestra un ejemplo de una tira reactiva de ST2 colocada en la parte inferior 110 del aparato 100. En el ejemplo mostrado en la fig. 4A, la tira reactiva está sostenida por el primer canal 177, el segundo canal 178 y la estructura de soporte 182. Pueden usarse diversos tipos de tiras reactivas en el aparato 100. Dos ejemplos de dichas tiras reactivas se describen a continuación con referencia a las fig. 4B y 4C.

La fig. 4B muestra los detalles de construcción de un ejemplo de una tira reactiva 405. La tira reactiva 405 puede incluir una base 407 que proporciona soporte estructural. Por ejemplo, la base puede construirse a partir de una lámina de 80 mm de grosor (por ejemplo, hecha de plástico, por ejemplo, poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliestireno, poliéster o plástico biodegradable tal como celuloide) sobre la que se laminan las otras partes de la tira reactiva. La tira reactiva incluye una almohadilla de conjugado 409 y una membrana 410. La almohadilla de conjugado 409 y la membrana 410 están dispuestas en la base 407 de modo que la membrana 410 esté en comunicación fluida con la almohadilla de conjugado 409. La almohadilla de conjugado 409 puede estar compuesta de un medio de filtración absorbente (por ejemplo, una almohadilla Grade 8964 de 38 mm fabricada por Ahlstrom Corporation). En algunas implementaciones, la almohadilla de conjugado puede incluir fibras de vidrio y/o poliéster. La almohadilla de conjugado 409 incluye uno o más conjugados 412 que se unen con ST2 presente en un líquido corporal (por ejemplo, plasma) para producir complejos de conjugado-ST2. Los conjugados pueden incluir, por ejemplo, un grupo indicador unido a anticuerpos que se unen a ST2. En algunas implementaciones, los anticuerpos que se unen a ST2 pueden incluir anticuerpos monoclonales tales como los anticuerpos monoclonales 7E4 o 9F8 antiST2.

El grupo indicador puede incluir, por ejemplo, partículas de oro y, en dichos casos, los anticuerpos se conjugan a oro coloidal. El grupo indicador también puede incluir restos fluorescentes (por ejemplo, fluoróforos tales como fluoresceína, rodamina o eosina) para implementaciones en que se usa un ensayo fluorescente. Como un ejemplo particular, el anticuerpo monoclonal 7E4 antiST2 puede conjugarse a oro coloidal 40 nM a 0,010 mg/ml de oro coloidal 1 OD. Como otro ejemplo particular, el anticuerpo 9F8 puede conjugarse a oro o restos fluorescentes para su uso en

un ensayo fluorescente.

En algunas implementaciones, la almohadilla de conjugado puede pretratarse para que incluya un tampón de bloqueo de conjugado. El tampón de bloqueo de conjugado incluye un agente tamponante, tal como borato o ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), Tris-HCl, Tris-base, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), solución salina tamponada con fosfato (PBS) y un agente de bloqueo (por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA), caseína, gelatina de pescado, polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), poli(acido acrílico) (PAA), poli(acido maleico acrílico) (PAMA) para bloquear la unión no específica de los anticuerpos usados en el ensayo de prueba.

En un ejemplo, el tampón de bloqueo de conjugado puede incluir, por ejemplo, una solución de borato 50 mM en seroalbúmina bovina (BSA) al 10 % y que tiene pH = 9,0. En otro ejemplo, el tampón de bloqueo de conjugado puede incluir una solución de ACES 100 mM, NaCl 25 mM, MgCl₂ 75 mM, en BSA al 3 %, polivinilpirrolidona al 1 % (promedio de PM 40K)(PVP-40), Triton X-100 al 0,25 %, pH 6,5. En otro ejemplo más, el tampón de bloqueo de conjugado puede incluir una solución de borato 10 mM, BSA al 3 %, PVP-40 al 0,25 %, Triton X-100 al 0,25 %, pH = 8,0. En algunas implementaciones, también puede usarse un diluyente de conjugado de borato 50 mM en BSA al 1 % y que tiene un pH = 9,0.

El conjugado puede pretratarse para que incluya el tampón de bloqueo de conjugado sumergiendo y remojando la almohadilla de conjugado en el tampón de bloqueo de conjugado durante un periodo de tiempo (por ejemplo, dos minutos). El exceso de tampón entonces puede retirarse de la almohadilla de conjugado, por ejemplo, colocando la almohadilla de conjugado entre capas de material absorbente (por ejemplo, toallas de papel) y aplicando presión. Las almohadillas de conjugado húmedas pueden entonces secarse (por ejemplo, a 37 °C durante una hora) y almacenarse desecadas (HR < 20 %) a temperatura ambiente.

Los conjugados 412 pueden añadirse a la almohadilla de conjugado 409, por ejemplo, pulverizando la almohadilla de conjugado con una solución que incluye los conjugados. La almohadilla de conjugado 409 entonces se seca (por ejemplo, en un horno de aire forzado a 37 °C durante una hora) y almacenarse desecada (HR < 20 %) a temperatura ambiente. La almohadilla de conjugado 409 puede recortarse hasta el tamaño apropiado y laminarse en la base 407.

La solución que incluye los conjugados que se usa para pulverizar la almohadilla de conjugado 409 puede prepararse de diversas maneras. En términos generales, el procedimiento es el siguiente. En primer lugar, al anticuerpo se dializa, por ejemplo, con fosfato 10 mM (pH ~ 7,3), y se ajusta una cantidad eficaz del grupo indicador, por ejemplo, oro coloidal de 40 nm, hasta un pH relativamente neutro, por ejemplo, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 10,0, por ejemplo, de 6,5 a 9,5, por ejemplo, el pH puede ser 7,0, usando un agente tamponante, por ejemplo, como se indica anteriormente, por ejemplo, K₂CO₃ 0,2 M. Entonces se añade una cantidad eficaz de los anticuerpos, por ejemplo, 10 µg del anticuerpo, a una cantidad de la mezcla de grupo indicador, por ejemplo, 1 ml de oro coloidal y la solución se mezcla durante un tiempo suficiente para mezclar minuciosamente todos los componentes, por ejemplo, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añade el agente de bloqueo, por ejemplo, BSA al 10 % en un agente tamponante, por ejemplo, borato 50 mM (pH ~ 9,0) usando un 10 % del volumen del grupo indicador, por ejemplo, oro coloidal, usado, y la solución se mezcla de nuevo, por ejemplo, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución entonces se centrifuga durante aproximadamente 30 minutos a 14 000 x G para formar un sedimento de los componentes que no se han disuelto. Después de retirar el sobrenadante y descartarse, el sedimento se resuspende en un diluyente de conjugado y se añade una cantidad apropiada para alcanzar una densidad óptica (DO) diana. En algunos casos, puede añadirse un azúcar, por ejemplo, sacarosa y/o trehalosa al conjugado de oro en cantidades apropiadas (por ejemplo, un 20 % y un 5 %, respectivamente) y puede mezclarse hasta disolverse.

En algunas implementaciones, la tira reactiva también puede incluir una almohadilla de muestra 414 sobre la que se distribuye la muestra (por ejemplo, sangre completa). La almohadilla de muestra 414 puede disponerse sobre la almohadilla de conjugado 409, y puede configurarse para permitir que una parte de la muestra pase a través hasta la almohadilla de conjugado 409. Por ejemplo, si la muestra usada para la tira reactiva es sangre completa, la almohadilla de muestra 414 puede configurarse para permitir que el plasma sanguíneo pase a través mientras se bloquean otros constituyentes de la sangre. Por esta razón, la almohadilla de muestra 414 también a veces puede denominarse almohadilla de separación de plasma. En algunas implementaciones, puede usarse una membrana de separación de plasma tal como la membrana de separación de plasma Vivid™ fabricada por Pall Corporation como la almohadilla de muestra 414.

En funcionamiento, una muestra (por ejemplo, plasma) recibida dentro de la almohadilla de conjugado 409 fluye desde la almohadilla de conjugado 409 hasta la membrana 410 y atraviesa la longitud de la membrana 410. La tira reactiva 405 también incluye una almohadilla absorbente 416 (a veces denominada también almohadilla de absorción capilar) para recoger la muestra residual que sale de la membrana. En algunas implementaciones, puede usarse una almohadilla CO95 fabricada por EMD Millipore Corporation como almohadilla absorbente 416. En otras implementaciones, puede usarse una almohadilla CO83, también fabricada por EMD Millipore Corporation, como almohadilla absorbente 416. La almohadilla absorbente 416 y la almohadilla de conjugado 409 se disponen en extremos opuestos (a lo largo de la longitud) de la membrana 410.

Pueden usarse diversas combinaciones de las partes constituyentes descritas anteriormente en la construcción de la

tira reactiva. Por ejemplo, para construir la tira reactiva 405 mostrada en la fig. 4B, la membrana 410 se lamina sobre la base 407. Entonces puede colocarse una almohadilla absorbente CO83 416 (por ejemplo, almohadilla de absorción capilar de 21 mm o 25 mm) en un extremo de la placa de soporte con un solapamiento (por ejemplo, un solapamiento de 2 mm) con la membrana 410. La almohadilla de conjugado 409 (por ejemplo, una almohadilla de conjugado de 36 mm o 38 mm) se lamina sobre la base 407 que solapa con la membrana una corta distancia para garantizar un buen contacto, por ejemplo, 2 mm. La almohadilla de muestra 414 (por ejemplo, una almohadilla de separación de sangre Vivid™ de 26 mm) se lamina entonces sobre la parte superior de la almohadilla de conjugado 409. Dos tiras de cinta de protección 420 se colocan entonces en ambos extremos de la almohadilla de muestra 414 de modo que una tira de la cinta de protección solape con la membrana y la otra tira de la cinta de protección solape con la almohadilla de conjugado. La lámina preparada de este modo entonces puede cortarse en tiras que se ajustan al canal dentro del casete.

En algunas implementaciones, la tira reactiva no incluye una almohadilla de muestra. Un ejemplo de dicha tira reactiva 450 se muestra en la fig. 4C. Para construir la tira reactiva 450, el procedimiento puede ser sustancialmente similar al seguido para construir la tira reactiva 405, con la excepción de que no se usa almohadilla de muestra o cintas de protección. La tira reactiva 450 también puede usarse como varilla de medición.

En ambas tiras reactivas 405 y 450, el ensayo de detección de ST2 se realiza sobre la membrana 410. En algunas implementaciones, puede usarse una membrana de nitrocelulosa (por ejemplo, HF135 fabricada por EMD Millipore Corporation) como membrana 410. La membrana 410 incluye una ubicación de ensayo 422 y una ubicación de control 424. La ubicación de ensayo 422 incluye un anticuerpo que se une específicamente a cualquier ST2 en la muestra, tal como los anticuerpos monoclonales 7E4 o 9F8 antiST2 a una concentración predeterminada (por ejemplo, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml o 2,0 mg/ml). La ubicación de control incluye otro anticuerpo que se une específicamente a algún componente del conjugado, tal como el anticuerpo antiST2, que puede unirse por un anticuerpo de cabra antiIgG de ratón a una concentración predeterminada (por ejemplo, 2,0 mg/ml, 0,5 mg/ml o 0,125 mg/ml). La ubicación de ensayo 422 y la ubicación de control 424 se colocan en bandas en la membrana usando, por ejemplo, un distribuidor frontal y a una tasa de distribución predeterminada (por ejemplo, 1 µl/cm). La membrana entonces se seca y se almacena desecada a temperatura ambiente.

En algunas implementaciones, la membrana 410 se pretrata usando un tampón de bloqueo de membrana. Un ejemplo de una solución usada como tampón de bloqueo de membrana es fosfato de sodio 100 mM, sacarosa al 0,1 %, BSA al 0,1 % y PVP-40 al 0,2 %, a pH 7,2. Se conocen y pueden usarse otros agentes de bloqueo. Ejemplos de dichos agentes de bloqueo incluyen seroalbúmina bovina (BSA) y caseína, leche en polvo, gelatina de piel de pescado y polietilenglicol (PEG). Para pretratar la membrana, la membrana 410 puede sumergirse lentamente en el tampón de bloqueo de membrana y dejar que logre absorción capilar a través de la membrana 410. El exceso de tampón puede retirarse por transferencia de la parte superior de la membrana 410, por ejemplo, usando un papel o tela, por ejemplo, un Kimwipe™. La membrana 410 entonces puede secarse (por ejemplo, a 37 °C durante 30 minutos), retirarse y almacenarse desecada (HR < 20 %) a temperatura ambiente hasta que se use.

Para realizar un ensayo usando el aparato 100 descrito anteriormente, una tira reactiva (por ejemplo, la tira reactiva 405) puede colocarse dentro del aparato 100 y una cantidad predeterminada de líquido de ensayo (por ejemplo, sangre o plasma) se distribuye en el acceso de muestra 120. Esto se muestra en la fig. 5A. En general, se precargarán casetes comerciales con la tira reactiva apropiada. Por ejemplo, 40 µl de sangre o 30 µl de plasma pueden distribuirse en el acceso de muestra 120 usando una pipeta, como se muestra en la fig. 5A. En algunas implementaciones, la muestra puede pretratarse con un bloqueante de anticuerpo humano antirratón (HAMA). Después de esperar durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, aproximadamente 1 minuto) para que la muestra se remoje, se distribuye un tampón de migración en el acceso de tampón 125. Esto se muestra en la fig. 5B. Para 40 µl de sangre o 30 µl de plasma, se pueden distribuir aproximadamente 120 µl del tampón de migración en el acceso de tampón 125. En algunas implementaciones, el conjugado 412 (como se muestra en la fig. 4B) no está presente en el momento dentro de la almohadilla de conjugado 409, y también se distribuye en el acceso de tampón 125. Si el conjugado 412 ya está presente dentro de la almohadilla de conjugado 409, se distribuye únicamente tampón de migración en el acceso de tampón 125. Dentro de la almohadilla de conjugado 409, el ST2 en la muestra se une con el conjugado 412 para producir complejos de conjugado-ST2. Estos complejos de conjugado-ST2 atraviesan la almohadilla de conjugado 409 y la membrana 410 y quedan unidos a los anticuerpos en la ubicación de control 424. Si el nivel de ST2 en la muestra está por encima de un umbral, no todo el ST2 está unido al conjugado 412. El ST2 no unido atraviesa la almohadilla de conjugado 409 y la membrana 410, donde queda unido a los anticuerpos en la ubicación de ensayo 422.

La tira se lee o evalúa de otro modo después de otro periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, de aproximadamente 5 a 25 minutos, por ejemplo, de 10 a 20 minutos, por ejemplo, 15 minutos). Si se usa un ensayo fluorescente, la tira reactiva puede evaluarse usando un lector de fluorescencia, por ejemplo, un ESE Fluorescent Reader. Si se usa un ensayo de oro, los resultados de ensayo se inspeccionan visualmente y se clasifican subjetivamente usando, por ejemplo, una escala calibrada para el ensayo específico.

El tampón de migración distribuido en el acceso de tampón 125 se formula para facilitar y/o facilitar el flujo de la muestra (por ejemplo, plasma) a través de la almohadilla de conjugado 409 y la membrana 410. El tampón de migración en general incluye un agente tamponante tal como ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), junto con

otros componentes (por ejemplo, detergentes tales como Tween-20 y Triton X-100). Una composición de ejemplo para el tampón de migración puede ser ACES 100 mM, una solución salina que puede usarse para conseguir una composición iónica deseable del tampón (por ejemplo, cloruro de magnesio 100 mM), Tween-20 al 0,1 %, Proclin 300 al 0,05 %, con pH de aproximadamente 6.5.

5 Las fig. 6A-6C muestran ejemplos de resultados de ensayo que se inspeccionan visualmente para determinar la presencia o ausencia de ST2 en la muestra. La fig. 6A muestra un resultado en que la línea de control 605 puede observarse (lo que indica, por lo tanto, que el ensayo se completó satisfactoriamente), pero no es visible la línea de ensayo. Dicha ausencia de una línea de ensayo visible puede indicar que el nivel de ST2 está por debajo de un nivel de límite (por ejemplo, 35 ng/ml) para el que el aparato está configurado para detectarlo. La fig. 6B muestra la línea de control 605, y una línea de ensayo tenue 610. La línea de ensayo tenue 610 puede indicar que el nivel de ST2 en la muestra correspondiente está cerca del nivel límite, pero significativamente por encima del nivel límite. La fig. 6C muestra una línea de control 605 claramente visible y una línea de ensayo 610 claramente visible. La línea de ensayo 610 clara indica que el nivel de ST2 en la muestra correspondiente está por encima del nivel límite.

15 En algunas implementaciones, puede usarse un dispositivo lector para analizar los resultados de ensayo para ensayos realizados usando las tiras reactivas de ST2 descritas anteriormente. Las fig. 7A y 7B muestran la parte anterior y posterior, respectivamente, de un ejemplo de dicho dispositivo lector 700 desarrollado por LRE Medical GmbH, Alemania. El dispositivo lector 700 incluye un interruptor de alimentación 725 y una sección de recepción 750 como se muestra en la fig. 7C. La sección de recepción 750 puede configurarse para que acepte al menos una parte del casete o alojamiento dentro del que se dispone una tira reactiva. Por ejemplo, la sección de recepción 750 puede incluir una sección deslizante que acepta el casete. En otro ejemplo, la sección de recepción puede incluir una abertura a través de la que se inserta una parte del casete en el dispositivo lector 700. En algunas implementaciones, el dispositivo lector 700 puede configurarse para que inicie un análisis de la tira reactiva automáticamente tras la inserción del casete en el lector. La maniobra también puede controlarse usando un comando proporcionado mediante una interfaz de usuario.

25 En algunas implementaciones, el dispositivo lector 700 puede incluir, por ejemplo, un sistema óptico para analizar la cantidad de analito en una tira reactiva de ST2. Por ejemplo, el dispositivo lector puede incluir un sistema óptico de fluorescencia configurado para un intervalo de funcionamiento particular tal como TF5 (es decir, excitación a -650 nm y emisión a -670 nm) para determinar cuantitativamente la cantidad de analito presente. El sistema óptico puede optimizarse para el intervalo de funcionamiento particular, y/o el tipo de fluorescencia que se tiene que analizar. En algunas implementaciones, el dispositivo lector 700 puede hacerse configurable por el usuario, por ejemplo, mediante una interfaz de usuario gráfica (GUI), para manipular los múltiples tipos diferentes de cartuchos de ensayo con diferentes ensayos.

35 En algunas implementaciones, el dispositivo lector 700 puede incluir una pantalla (por ejemplo, pantalla gráfica de color de 3,5" LCD QVGA con retroiluminación) y un teclado 704 para el funcionamiento del dispositivo. El teclado 704 puede incluir, por ejemplo, cualquier combinación de teclas blandas, teclas funcionales (por ejemplo, expulsar, menú principal, alimentación de papel), teclas de navegación (por ejemplo, arriba, abajo, izquierda, derecha), teclas de carácter y teclas numéricas. El dispositivo 700 también puede incluir uno o más controladores incorporados que programan, gestionan y accionan diversos motores, accionadores, sensores, etc. para analizar tiras reactivas y proporcionar resultados. En algunas implementaciones, la GUI puede usarse para presentar una o más interfaces accionadas por el menú para dar soporte a una o más funciones tales como desarrollar ensayos, realizar control de calidad, recuperar resultados almacenados, consultar bases de datos, realizar comprobaciones del sistema, facilitar la configuración del instrumento y facilitar el desarrollo del ensayo.

45 En algunas implementaciones, el dispositivo lector 700 puede incluir un sistema óptico de iluminación configurado para emitir radiación electromagnética que incide en la parte de la tira reactiva que se está evaluando. El dispositivo lector también incluye un sistema óptico receptor configurado para detectar partes de la energía electromagnética reflejada, refractada, absorbida, emitida y/o transmitida a través de la tira reactiva. En algunas implementaciones, el dispositivo lector 700 puede incluir un módulo de cámara para capturar información de la imagen que pertenece a la parte de la tira reactiva que se está evaluando. El dispositivo lector 700 también puede incluir uno o más procesadores para analizar la información obtenida por el sistema óptico de iluminación, el sistema óptico receptor y/o el módulo de cámara. En algunas implementaciones, el dispositivo lector 700 también puede incluir un módulo de identificación (por ejemplo, un lector de etiquetas de RFID, o lector de código de barras) para determinar automáticamente la información de identificación del casete o alojamiento insertado en el alojamiento. El lector 700 también puede incluir uno o más de un dispositivo de salida acústico (por ejemplo, un altavoz), una impresora interna (por ejemplo, para imprimir los resultados), un sensor de temperatura, un dispositivo de almacenamiento de datos (por ejemplo, memoria de acceso aleatorio, disco duro, etc.), y uno o más puertos de comunicación. Se muestran ejemplos de puertos de comunicación 730 en la fig. 7B, y pueden incluir interfaces centrales de USB (USBH), interfaz de red de área local (LAN), interfaz PS2 e interfaz de dispositivo USB (USBD). El dispositivo lector 700 también puede configurarse para que tenga capacidades de comunicación inalámbrica.

60 La información capturada por los sistemas ópticos dentro del dispositivo lector 700 puede analizarse para obtener información cuantitativa sobre los analitos dentro de una tira reactiva. Por ejemplo, la información puede analizarse para determinar el nivel de ST2 dentro de una muestra ensayada usando la tira reactiva. El análisis puede realizarse,

por ejemplo, en el dispositivo lector incorporado 700 usando uno o más procesadores del dispositivo, o en un dispositivo informático remoto con el que se comunica el dispositivo lector 700.

5 El análisis puede incluir diversos procedimientos. En algunas implementaciones, la información capturada puede analizarse para determinar un nivel de oscuridad para la línea de ensayo y/o la línea de control de la tira reactiva, y el nivel de oscuridad se correlaciona con una cantidad de ST2 en la muestra. En algunas implementaciones, el nivel de ST2 se determina usando múltiples tiras reactivas para analizar la muestra del mismo individuo.

10 En algunas implementaciones, para cada desarrollo, la tira reactiva se lee múltiples veces, posiblemente a intervalos sustancialmente periódicos. Por ejemplo, para cada desarrollo de un ensayo, una tira reactiva correspondiente puede leerse una vez cada minuto diez veces para obtener diez lecturas. Las diferencias absolutas entonces pueden calcularse entre cada par de lecturas, y los resultados se almacenan como una estructura de datos apropiada tal como una matriz. Para el ejemplo de diez lecturas, el tamaño de la matriz sería 10 X 10. Las filas y columnas de la matriz entonces se suman y los resultados se almacenan. Los valores que corresponden a las diferencias más pequeñas entonces pueden seleccionarse para calcular el nivel representativo de oscuridad para la tira reactiva. Por ejemplo, pueden elegirse cinco valores correspondientes a las diferencias más pequeñas y después promediarse para determinar el nivel representativo de oscuridad usado en la determinación de la cantidad de ST2 en la muestra correspondiente.

15 Usando el aparato y las tiras reactivas descritas en el presente documento, los niveles de ST2 en el organismo puede determinarse fácilmente y de manera fiable. Dicha determinación es beneficiosa al menos porque las elevadas concentraciones de ST2 son notablemente pronósticas para muerte en un año, con una drástica divergencia en las curvas de supervivencia para aquellos con ST2 elevado poco después de la presentación, independientemente del diagnóstico subyacente. Como un ejemplo, hay una drástica relación entre elevaciones de ST2 y el riesgo de mortalidad en un año después de presentación con disnea. La relación entre ST2 y muerte en pacientes con disnea puede ser independiente del diagnóstico, y desbanca todos los demás predictores de biomarcador de mortalidad, incluyendo otros marcadores de inflamación, mionecrosis, disfunción renal y notablemente NT-proBNP, un marcador descrito recientemente con un valor para predecir la muerte en esta población (Januzzi y col., Arch. Intern. Med. 2006; 166(3):315-20). De hecho, la mayor parte de la mortalidad en el estudio estaba concentrada entre sujetos con niveles elevados de ST2 en la presentación; sin embargo, la combinación de ST2 elevado y NT-proBNP se asoció con las tasas más altas de muerte en un año.

20 Las concentraciones elevadas de ST2 también pueden correlacionarse con la presencia de enfermedad grave en un sujeto, independientemente de la causa subyacente de la enfermedad. Por lo tanto, para sujetos no diagnosticados, el aparato descrito en el presente documento puede usarse para determinar la agresividad con la que debe buscarse un diagnóstico. Por ejemplo, un alto nivel de ST2 indicaría la presencia de enfermedad grave, y sugeriría que el sujeto debe tratarse como un caso de alto riesgo. Para sujetos con un diagnóstico conocido, el aparato descrito en el presente documento puede usarse para ayudar a determinar la gravedad de la patología subyacente porque un nivel mayor de ST2 está asociado con enfermedad más grave.

25 La tira reactiva, y el aparato en general puede usarse en la evaluación del pronóstico y en controlar la eficacia del tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares. El uso de ST2 como marcador para enfermedades se ha descrito en las siguientes patentes de Estados Unidos y solicitudes publicadas: US 2009/0305265 (Snider y col.), US 2010/0009356 (Snider y col.), US 2011/0053170 (Snider y col.), US 8.597.958 (Lee), US 8.617.825 (Snider y col.), US 2014/0045200 (Snider y col.), US 2012/0065897 (Snider y col.), US 7.432.060 (Lee), US 7.655.415 (Lee), US 7.670.769 (Lee), US 7.985.558 (Lee), US 8.420.785 (Snider y col.), US 2010/0055683 (Snider y col.), US 8.530.173 (Lee), US 2013/0273562 (Lee), US 8.734.769 (Lee), US 7.989.210 (Lee), US 7.998.683 (Snider y col.), US 8.090.562 (Snider y col.), US 2013/0177931 (Snider y col.), US 2013/0244236 (Snider y col.), US 2012/0276551 (Snider), US 2014/0058743 (Snider y col.), US 2013/0071404 (Snider y col.), US 2013/0345805 (Snider y col.), solicitud de Estados Unidos n.º 14/244.526, presentada el 3 de abril de 2014 (Snider y col.), US 2014/0051773 (Snider), US 2012/0040381 (Snider y col.), solicitud de Estados Unidos n.º 14/267.487 (Snider) y documento US 2013/0317030 (Lee).

Ejemplos

30 La tecnología se describe adicionalmente usando los siguientes ejemplos ilustrativos particulares. En los siguientes ejemplos, se evaluaron las características de rendimiento analítico y clínico convencionales de un aparato de ensayo que usa la tira reactiva de la fig. 4C. Las características incluyeron sensibilidad analítica, linealidad, precisión, efecto gancho y sensibilidad a sustancias interferentes.

Sensibilidad analítica

35 El rendimiento analítico (sensibilidad) se determinó siguiendo los procedimientos proporcionados en: "Protocolo CLSI 17-A2, Evaluación de la capacidad de detección para procedimientos de medición de laboratorio clínico; Guía aprobada - 2.ª edición". En ausencia de suero/plasma humano sin ST2, se usó suero bovino fetal (FBS) como blanco en la determinación de un límite del blanco (LoB). La determinación del LoB se realizó midiendo sesenta réplicas durante cuatro días a partir de tres lotes de casete, con quince réplicas por día. Para determinar un límite de detección

(LoD), se midieron sesenta réplicas de cuatro muestras diferentes de plasma humano con concentraciones de ST2 bajas en series de quince réplicas cada una durante cuatro días consecutivos usando tres lotes de casete. Los resultados en la tabla 1, a continuación. Como se encontró que el límite de cuantificación (LoQ) era menor que el LoD, el valor de LoD se usó para LoQ.

5

Tabla 1

Parámetro	Valor
Límite del blanco (LoB)	5,5 ng/ml
Límite de detección (LoD)	12,5 ng/ml
Límite de cuantificación (LoQ)	9,9 ng/ml

Linealidad

La linealidad se determinó usando los procedimientos proporcionados en: "Protocolo CLSI EP6-A, Evaluación de la linealidad de procedimientos de medición cuantitativos: Una estrategia estadística; Guía aprobada". Como se ilustra en la fig. 8A, se encontró que el ensayo era aproximadamente lineal desde el LoQ de 12,5 ng/ml hasta un límite superior de 257 ng/ml. Además, como se muestra en la fig. 8B, las concentraciones de ST2 se ensayaron para hasta 200 ng/ml, y no se observó desviación significativa de la linealidad o presencia de efecto gancho.

10

Precisión

La precisión del ensayo se determinó de acuerdo con los procedimientos proporcionados en: "CLSI EP5-A2, Evaluación del rendimiento de precisión de procedimientos de medición cuantitativos; Guía aprobada - segunda edición". Los resultados se proporcionan en la tabla 2:

15

Tabla 2

Nivel	CV dentro del desarrollo	CV entre desarrollos	CV total
20 ng/ml	15,4 %	16,3 %	22,4 %
32 ng/ml	4,9 %	13,3 %	14,2 %
81 ng/ml	10,8 %	11,1 %	15,5 %

Concordancia

Se ensayó un rendimiento comparativo del ensayo con el del ensayo de ST2 Presage®. Esto se hizo midiendo ST2 usando ambos formatos de ensayo en una serie de sesenta muestras de plasma con EDTA y evaluando la comparación de procedimientos mediante regresión de Passing y Bablok. El análisis (que se representa gráficamente en el diagrama de la fig. 9) no mostró desviación significativa de la linealidad ($p = 0,75$) con una pendiente de 1,01 y una intersección de 5,8. Se encontró que el coeficiente de correlación era 0,92.

20

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de ensayo que comprende:

una tira reactiva que tiene un primer extremo y un segundo extremo opuesto;
un alojamiento para la tira reactiva, en el que el alojamiento comprende:

5 una primera sección que comprende una cara exterior y una cara interior, en la que la cara interior de la primera sección comprende un canal para recibir la tira reactiva a lo largo de la longitud de la primera sección, y una segunda sección que comprende una cara exterior y una cara interior, en la que la segunda sección está configurada para fijarse a la primera sección de modo que en una configuración fijada la cara interior de la primera sección esté enfocada a la cara interior de la segunda sección, y la primera y segunda sección conjuntamente encierran la tira reactiva dentro del alojamiento, en el que la segunda sección comprende:

10 un acceso de tampón configurado para permitir que una solución de tampón se distribuya a una parte de la tira reactiva próxima a un primer extremo de la tira reactiva,
una ventana de ensayo configurada para facilitar las imágenes de una o ambas de una ubicación de ensayo y una ubicación de control en la tira reactiva,
15 un acceso de muestra dispuesto entre el acceso de tampón y la ventana de ensayo, estando configurado el acceso de muestra para posibilitar que una muestra de plasma sanguíneo o sangre completa se distribuya a la tira reactiva, y
un conjunto de proyecciones dispuesto sobre la cara interior de la segunda sección entre la ventana de ensayo y el acceso de muestra de modo que, en la configuración fijada, cada proyección en el conjunto de proyecciones está en contacto con la tira reactiva, en el que
20 una altura de al menos una proyección en el conjunto de proyecciones es diferente de una altura de otra proyección en el conjunto de proyecciones, y las alturas de las diferentes proyecciones están configuradas de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produce un gradiente de presión que permite que un líquido fluya a un caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva entre la
25 primera y la última proyección en el conjunto de proyecciones.

2. El aparato de ensayo de la reivindicación 1, que comprende además una etiqueta de identificación de radiofrecuencia (RFID) configurada para almacenar información asociada con la tira reactiva; y en el que la primera y segunda sección conjuntamente encierran la etiqueta de RFID y la tira reactiva dentro del alojamiento.

3. El aparato de ensayo de la reivindicación 1 o 2, en el que el caudal predeterminado es de modo que el líquido fluya desde la parte de la tira reactiva adyacente al acceso de tampón de la segunda sección hasta la parte de la tira reactiva adyacente a la ventana de ensayo de la segunda sección en 20 minutos o en 15 minutos.

4. El aparato de ensayo de la reivindicación 1 o 2, en el que el conjunto de proyecciones es un conjunto de salientes.

5. El aparato de ensayo de la reivindicación 4, en el que las distancias entre los salientes son sustancialmente iguales.

6. El aparato de ensayo de la reivindicación 4, en el que el conjunto de proyecciones incluye cuatro salientes, estando dispuesto un primer saliente más cerca del acceso de muestra que los otros salientes, estando dispuesto un cuarto saliente más cerca de la ventana de ensayo que los otros salientes, y estando dispuesto un segundo saliente y un tercer saliente entre el primer y el cuarto saliente; o en el que el conjunto de proyecciones incluye tres salientes, estando dispuesto un primer saliente más cerca del acceso de muestra que los otros salientes, estando dispuesto un tercer saliente más cerca de la ventana de ensayo que los otros salientes, y estando dispuesto un segundo saliente entre el primer y el tercer saliente.

7. El aparato de ensayo de la reivindicación 1 o 2, en el que la primera sección incluye múltiples proyecciones de fijación que están configuradas para fijarse a los correspondientes receptáculos de fijación dispuestos en la segunda sección, en la que las dimensiones de las proyecciones de fijación y los receptáculos de fijación están configurados de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produzca el gradiente de presión que permita que el líquido fluya al caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva.

8. Un sistema de ensayo para el biomarcador cardiaco ST2, que comprende:

A) una tira reactiva configurada para facilitar la detección de un nivel umbral de ST2 en plasma sanguíneo, comprendiendo la tira reactiva:

50 una base;
una pluralidad de conjugados, comprendiendo cada conjugado un grupo indicador unido al primer anticuerpo que se une a ST2;
una almohadilla de conjugado dispuesta a lo largo de una longitud de la base y configurada para alojar la pluralidad de conjugados que se unen con ST2 para producir complejos de conjugado-ST2, en la que la almohadilla de conjugado está configurada además para recibir la muestra de plasma sanguíneo;
55 una pluralidad de segundos anticuerpos que se unen a ST2; y

una pluralidad de terceros anticuerpos que se unen a los complejos de conjugado-ST2; y una membrana dispuesta en la base de modo que la membrana esté en comunicación fluida con la almohadilla de conjugado, en el que la pluralidad de segundos anticuerpos se une a la membrana en una ubicación de ensayo y la pluralidad de terceros anticuerpos se une a la membrana en una ubicación de control dispuesta más lejos de la almohadilla de conjugado que la ubicación de ensayo; y

B) un alojamiento para la tira reactiva, en el que el alojamiento comprende:

una primera sección que comprende una cara exterior y una cara interior, en la que la cara interior de la primera sección comprende un canal para recibir la tira reactiva a lo largo de la longitud de la primera sección, y una segunda sección que comprende una cara exterior y una cara interior, en la que la segunda sección está configurada para fijarse a la primera sección de modo que en una configuración fijada la cara interior de la primera sección esté enfocada a la cara interior de la segunda sección, y la primera y segunda sección conjuntamente encierran la tira reactiva dentro del alojamiento, en el que la segunda sección comprende:

un acceso de tampón configurado para permitir que una solución de tampón se distribuya a una parte de la tira reactiva próxima a un primer extremo de la tira reactiva, una ventana de ensayo configurada para facilitar las imágenes de una o ambas de una ubicación de ensayo y una ubicación de control en la tira reactiva,

un acceso de muestra dispuesto entre el acceso de tampón y la ventana de ensayo, estando configurado el acceso de muestra para posibilitar que una muestra de plasma sanguíneo se distribuya en la tira reactiva,

y un conjunto de proyecciones dispuesto sobre la cara interior de la segunda sección entre la ventana de ensayo y el acceso de muestra de modo que, en la configuración fijada, cada proyección en el conjunto de proyecciones está en contacto con la tira reactiva, en el que

una altura de al menos una proyección en el conjunto de proyecciones es diferente de una altura de otra proyección en el conjunto de proyecciones, y las alturas de las diferentes proyecciones están configuradas de modo que, en la configuración fijada, el conjunto de proyecciones produce un gradiente de presión que permite que un líquido fluya a un caudal predeterminado a lo largo de la longitud de la tira reactiva entre la primera y la última proyección en el conjunto de proyecciones;

una etiqueta de identificación dispuesta sobre o dentro del alojamiento, en el que la etiqueta de identificación está configurada para almacenar información asociada con la tira reactiva; y

un dispositivo lector configurado para aceptar al menos una parte del alojamiento dentro del lector, comprendiendo el dispositivo lector un sistema óptico que toma imágenes de una o ambas de la ubicación de ensayo y la ubicación de control en la tira reactiva, y presenta un nivel estimado de ST2 en la muestra de plasma sanguíneo.

9. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que la tira reactiva comprende además una almohadilla de separación de plasma en comunicación fluida con una parte de la almohadilla de conjugado, en el que la almohadilla de separación de plasma está dispuesta y configurada para recibir la muestra de sangre completa y para pasar plasma sanguíneo desde la muestra de sangre completa hasta la almohadilla de conjugado mientras impide el paso de otros componentes de la muestra de sangre completa a la almohadilla de conjugado.

10. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que cualquiera del primer o segundo anticuerpo o ambos se unen específicamente a ST2.

11. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, que comprende además una almohadilla absorbente dispuesta en la base y en comunicación fluida con la membrana en un extremo o lateral de la membrana opuesto a la almohadilla de conjugado, en la que la almohadilla absorbente está configurada para absorber plasma y tampón que ha atravesado a través de la membrana.

12. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que la almohadilla de conjugado está dispuesta en la base para recibir una solución de tampón y, en (b) una parte de la almohadilla de conjugado que recibe la solución de tampón no está en contacto con la almohadilla de separación de plasma.

13. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que la almohadilla de conjugado comprende fibras que comprenden vidrio, poliéster, o tanto vidrio como poliéster.

14. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que los primeros anticuerpos son anticuerpos monoclonales, preferentemente anticuerpos monoclonales 7E4 antiST2 que se conjugan con restos fluorescentes o a oro coloidal.

15. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que los segundos anticuerpos son anticuerpos monoclonales 9F8 antiST2.

16. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que los terceros anticuerpos son anticuerpos de cabra antiIgG de ratón.

17. El sistema de ensayo de la reivindicación 8, en el que una primera parte que incluye los segundos anticuerpos cambia de aspecto dependiendo de la cantidad de conjugado unido presente en el plasma sanguíneo que atraviesa la primera parte.

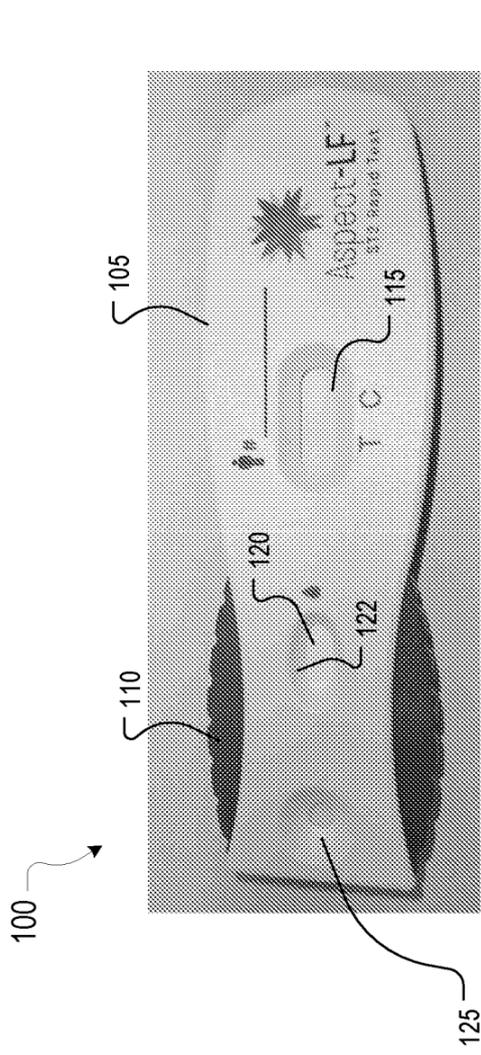


FIG. 1A

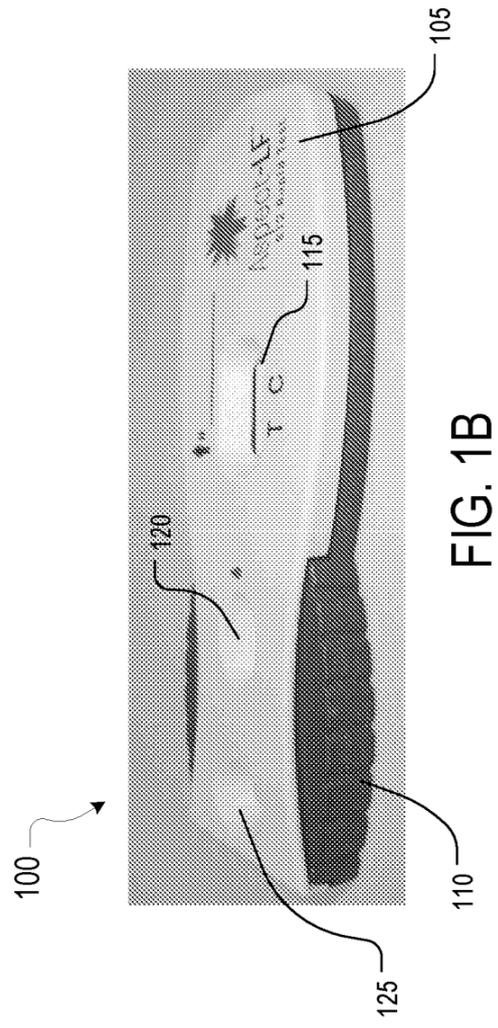


FIG. 1B

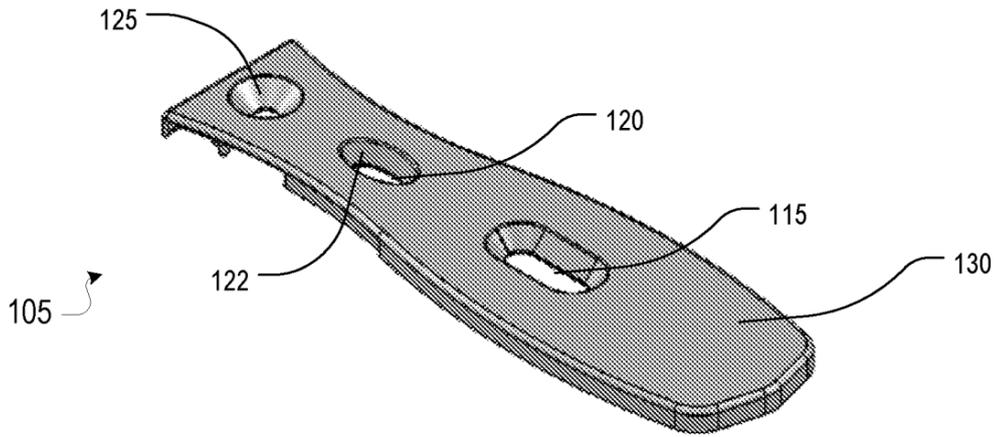


FIG. 2A

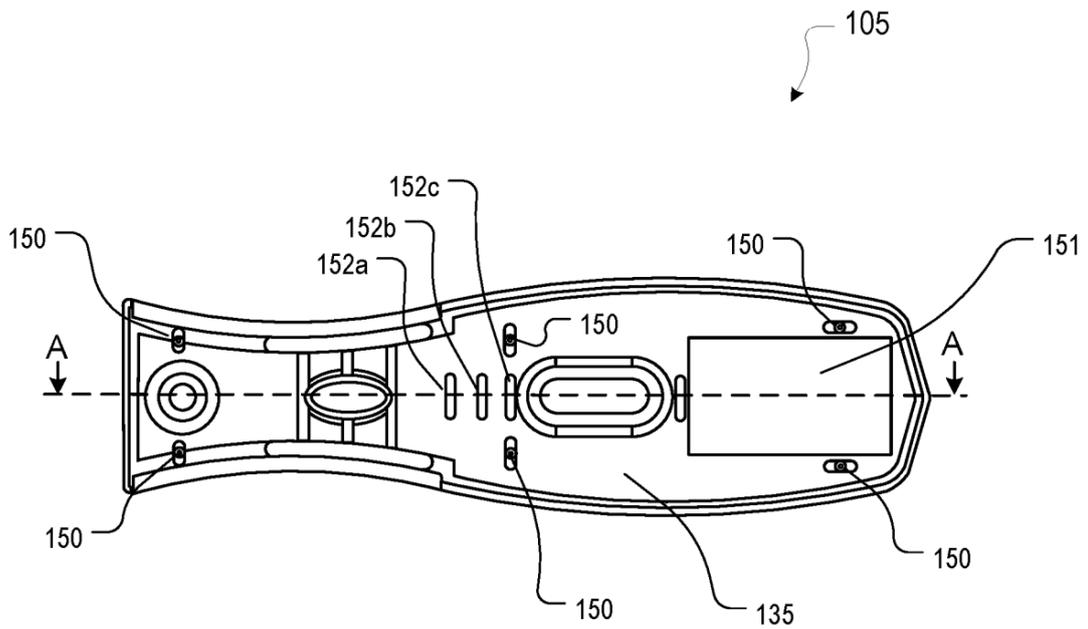
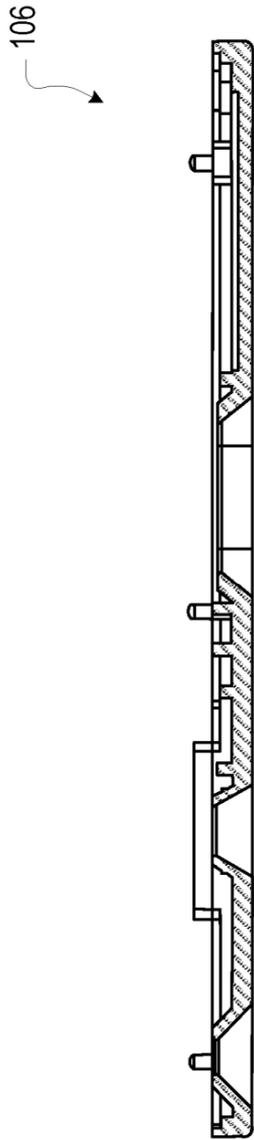


FIG. 2B



SECCIÓN A-A

FIG. 2C

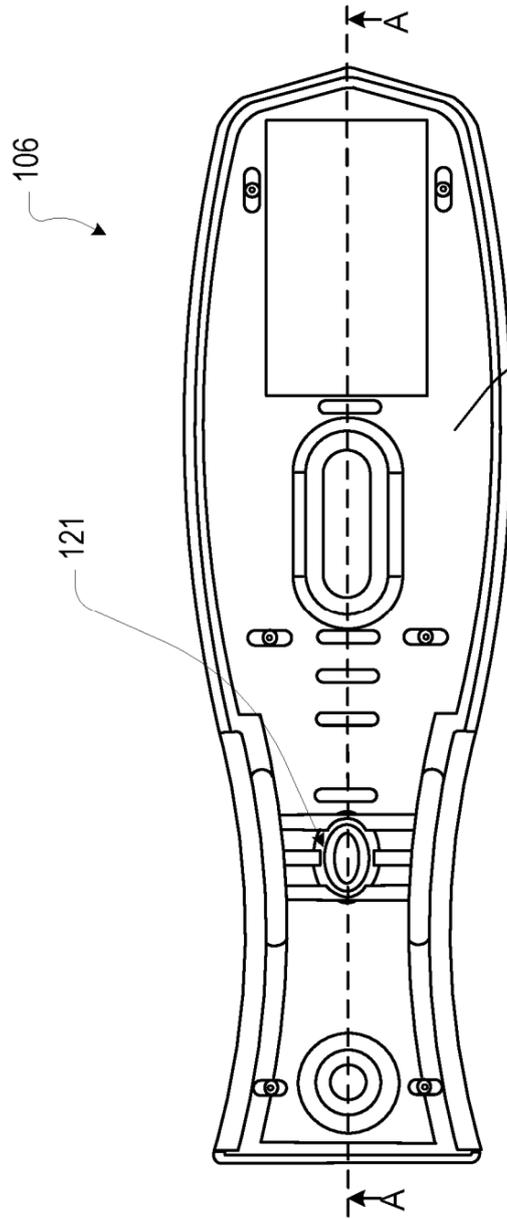


FIG. 2D

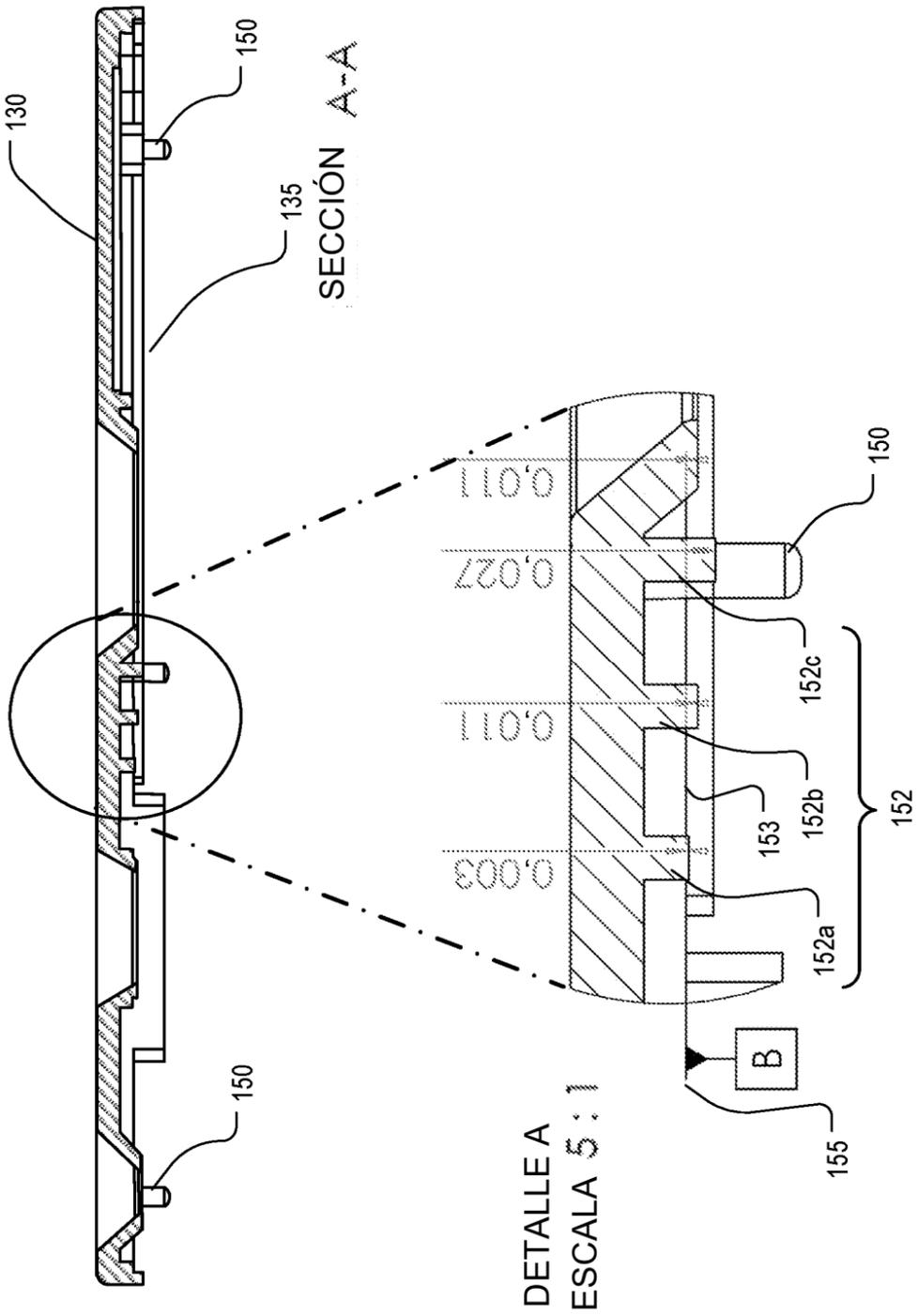


FIG. 2E

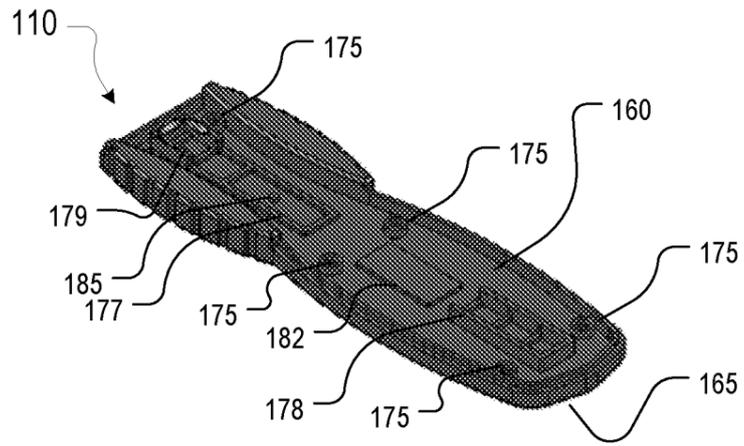


FIG. 3A

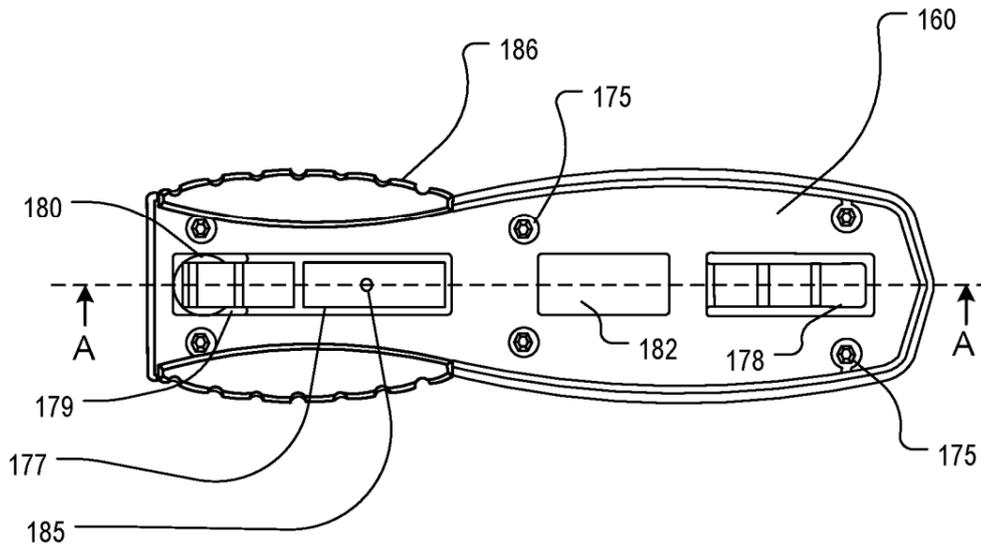


FIG. 3B

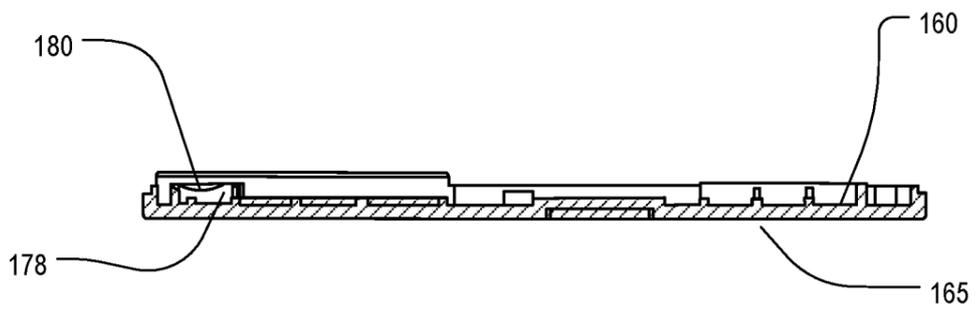


FIG. 3C

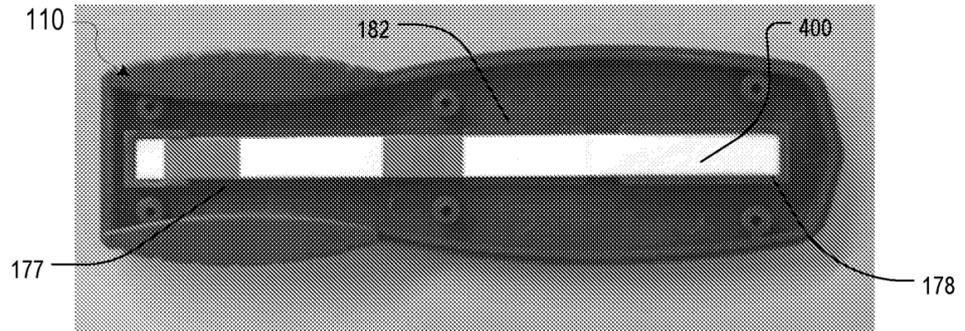


FIG. 4A

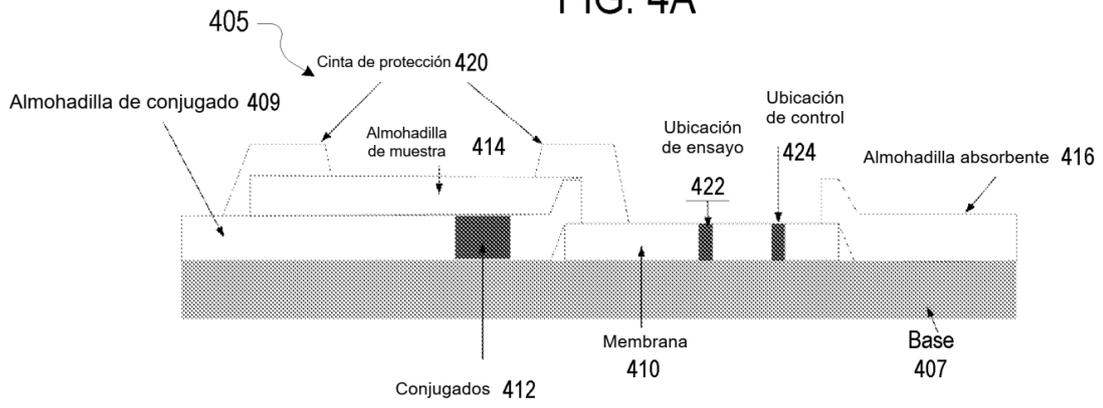


FIG. 4B

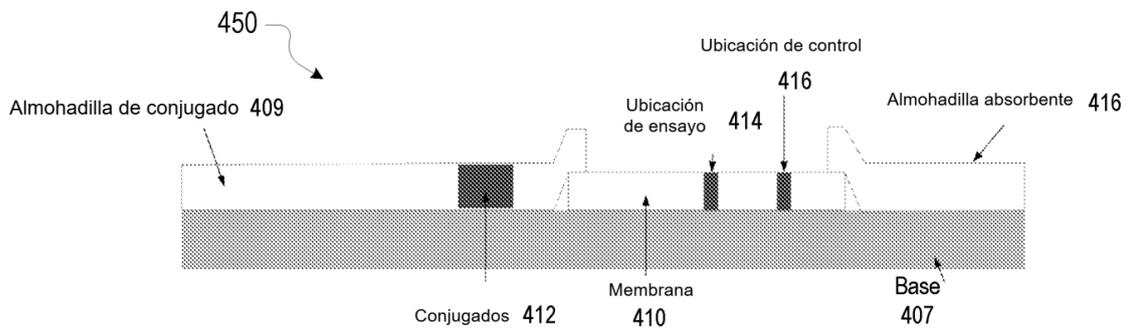


FIG. 4C

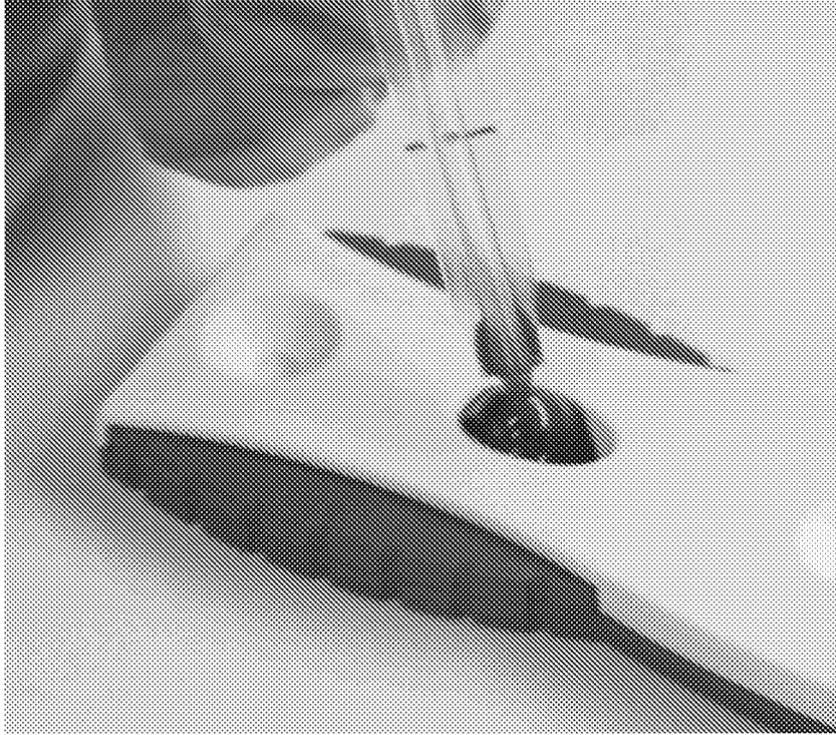


FIG. 5A

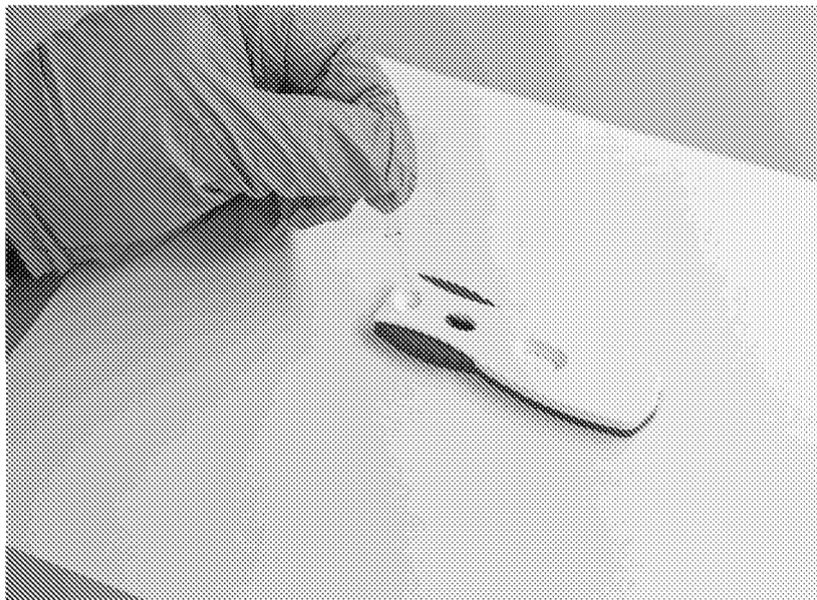


FIG. 5B

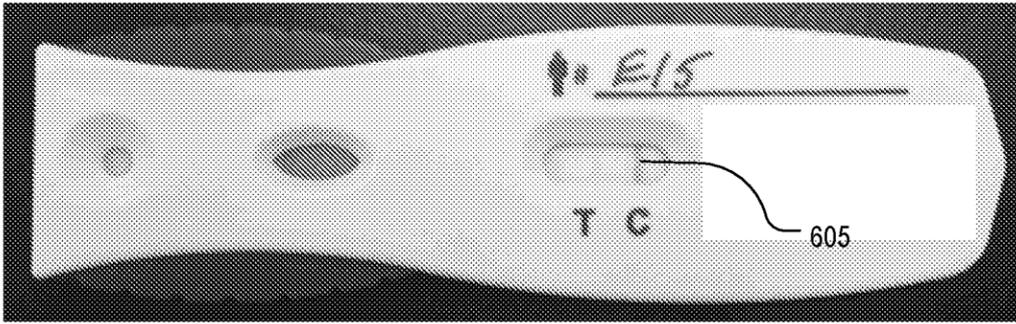


FIG. 6A

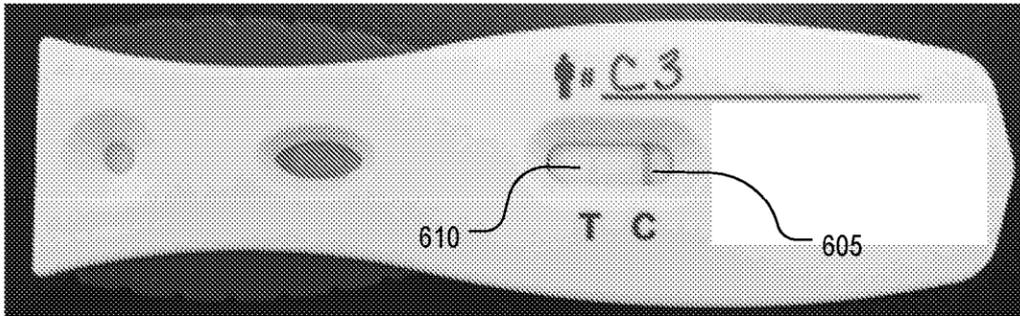


FIG. 6B

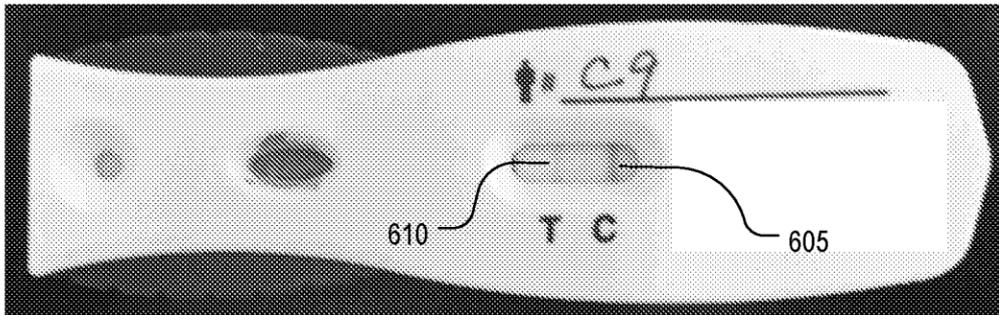


FIG. 6C

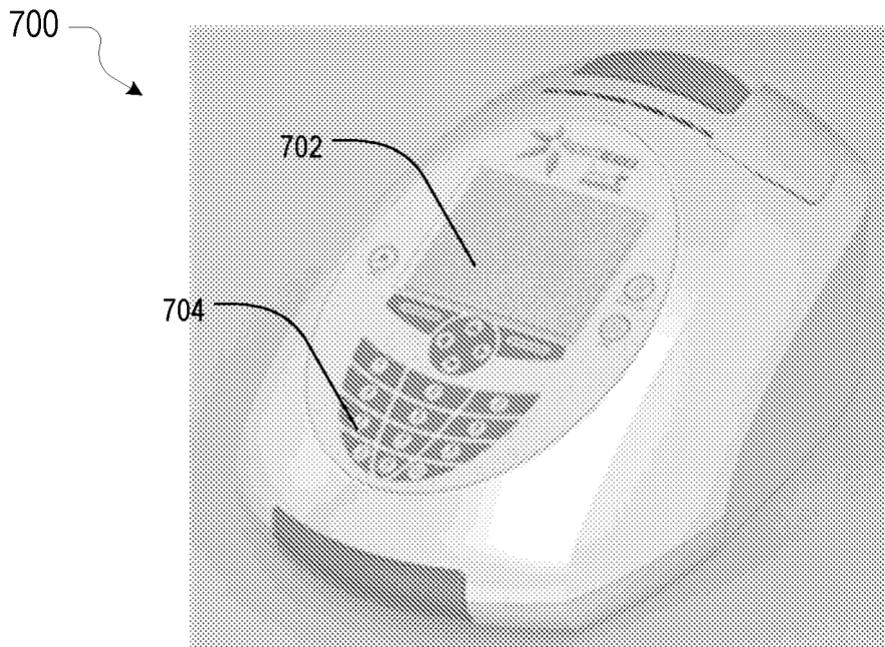


FIG. 7A

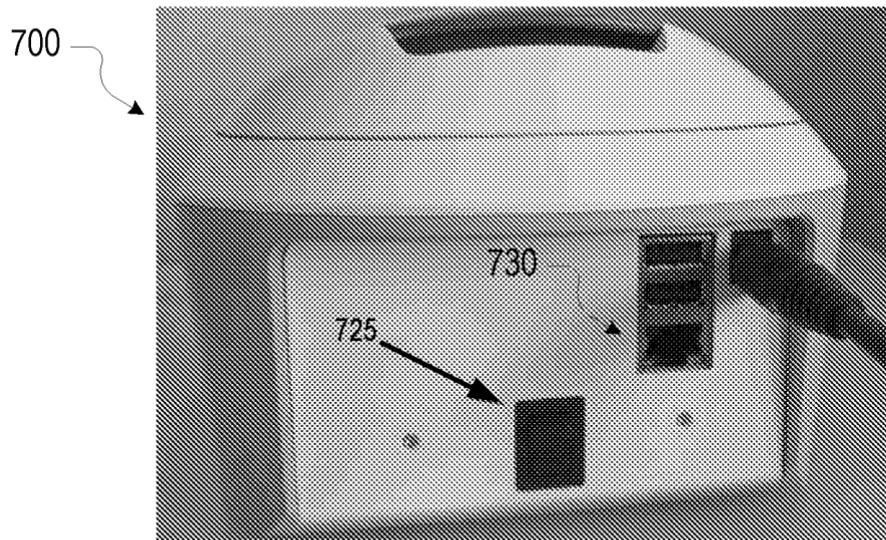


FIG. 7B



FIG. 7C

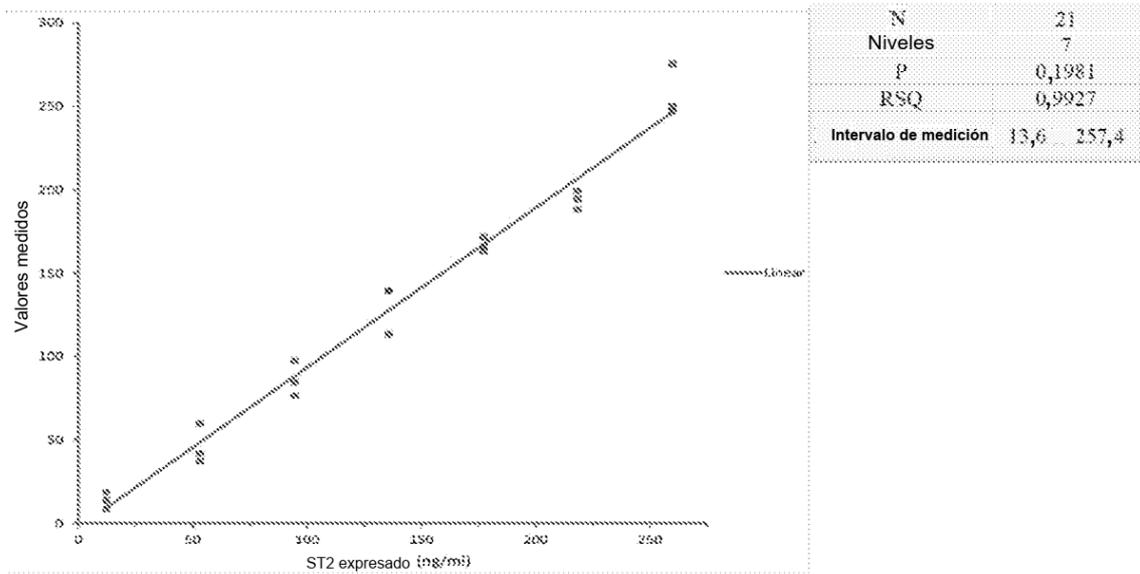


FIG. 8A

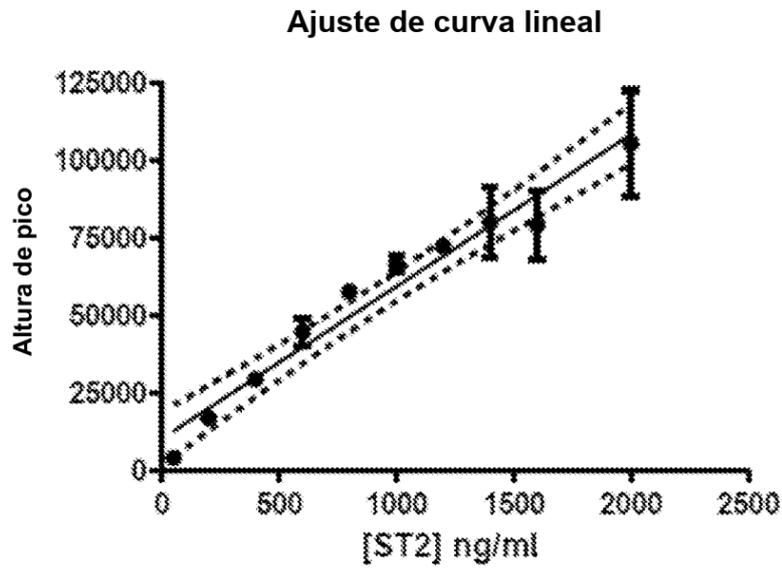


FIG. 8B

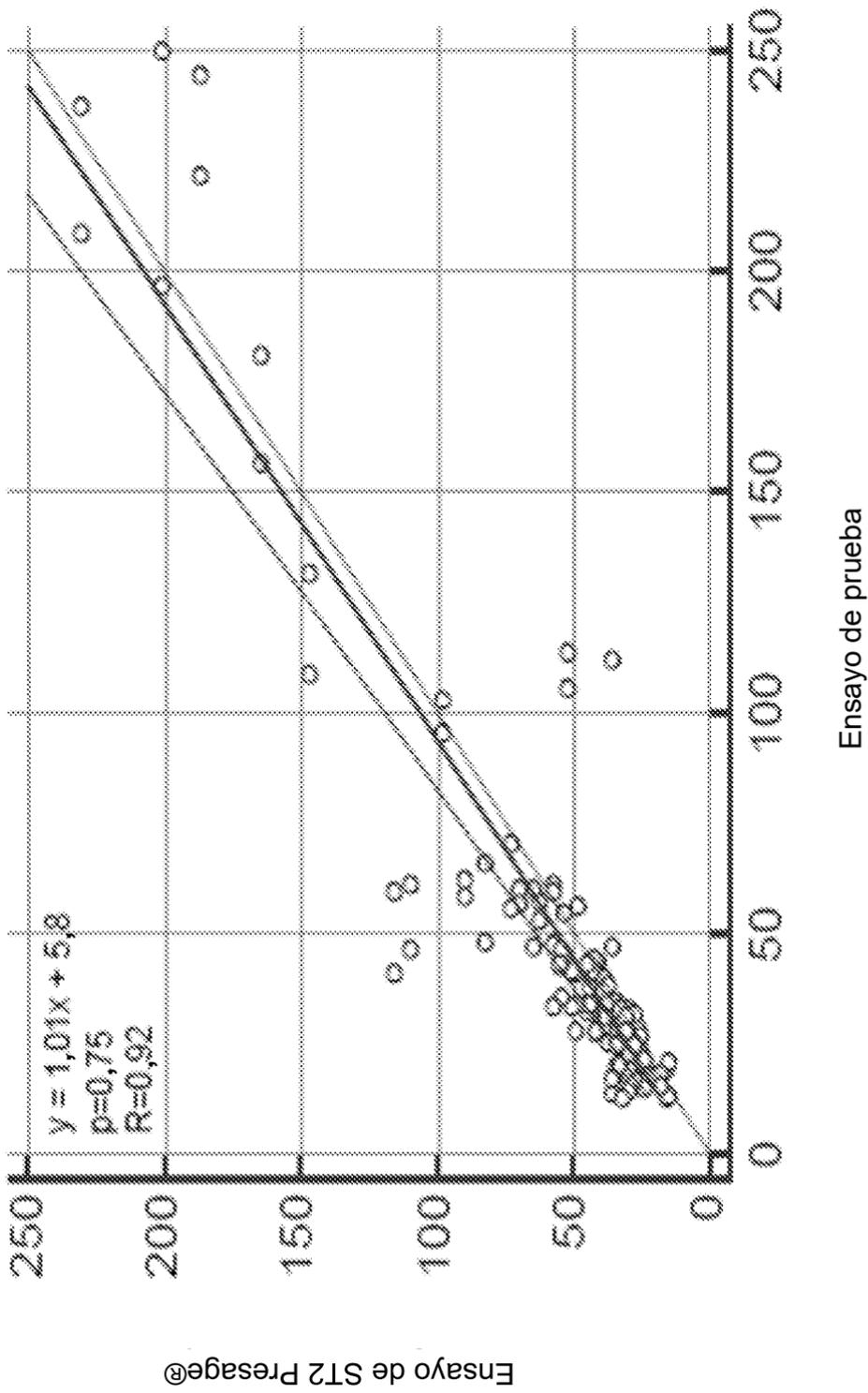


FIG. 9