



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102105795 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 200980128973. 0

(22) 申请日 2009. 06. 03

(30) 优先权数据

0810142. 0 2008. 06. 04 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 01. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2009/050619 2009. 06. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/147437 EN 2009. 12. 10

(73) 专利权人 美艾利尔瑞士公司

地址 瑞士楚格

(72) 发明人 杰恩·埃利斯 杰恩·马歇尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 谷惠敏 穆德骏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101147069 A, 2008. 03. 19, 说明书第 4 页
倒数第 2 段, 实施例 1-4, 权利要求 1-31, 说明书附
图 1-3.

CREININ MITCHELL D et al., .Accuracy
of serum β -human chorionic gonadotropin
cutoff values at 42 and 49 days' gestation.
《american journal of obstetrics and
gynecology》. 2001, 第 185 卷 (第 4 期), 966-969.

审查员 徐强一

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 12 页

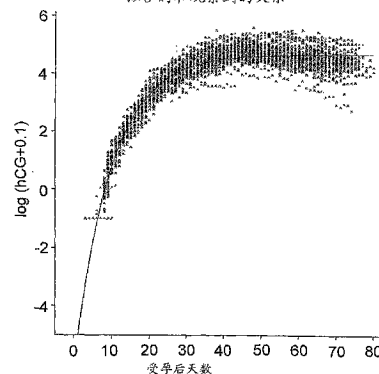
(54) 发明名称

用于测量 hCG 的测定阅读器、装置以及方法

(57) 摘要

在此披露了一种用于在一个雌性哺乳动物受
试者中确定一个定量估算的受孕后时间长度的方
法, 该方法包括 :a) 提供一个怀疑含有 hCG 的液
体样品 ;b) 借助于一个测定或测定装置对一个分
析物测量信号进行测量, 该测量信号的值取决于
hCG 的水平 ;c) 将该测量的信号值与一个分析物
的阈值进行比较, 其中所述分析物阈值对应于一个
受孕后时间 ;d) 基于步骤 (c) 中的比较对受孕
后时间的长度提供一个定量估算。

妊娠天数对 $\log(hCG+0.1)$ 的原始数据以及拟合的指数曲线
拟合的和观察到的关系



1. 一种测定结果阅读器和测定装置的组合,用于计算在女性人类受试者中的受孕后时间长度的定量估算,该测定结果阅读器包括:

- a) 对应于受孕后 14 天的一个存储的第一分析物阈值;
- b) 对应于受孕后 21 天的一个存储的第二分析物阈值;
- c) 一个存储的最小怀孕阈值;

b) 测量装置,该测量装置用于测量对应于从所述受试者得到的尿样中的 hCG 水平的分析物信号值并且将所述分析物信号值与所述最小怀孕阈值以及存储的第一和第二分析物阈值进行比较,由此基于该比较提供一个对受孕后时间长度的定量估算;

c) 用于显示受孕后时间的显示装置,其中该受孕后时间是相对于 LH 峰的日期来定义的,

其中由所述显示装置显示的结果如下:

如果所述分析物信号值小于所述最小怀孕阈值,则显示“未怀孕”;

如果所述分析物信号值小于所述第一分析物阈值但大于所述最小怀孕阈值,则显示 1 到 2 周妊娠;

如果所述分析物信号值大于或等于所述第一分析物阈值但小于或等于所述第二分析物阈值,则显示 2 到 3 周妊娠;

如果所述分析物信号值大于所述第二分析物阈值,则显示 3+ 周妊娠;并且

其中,所述测定装置包括:至少两个测定流动路径,每个路径能够在不同的各自的浓度范围上测量 hCG,以及一个共享的参照区,其中,在用于一个测定流路径的所述参照区获得的所述信号值被用于补偿在另一个测定流路径的检测区获得的所述信号值。

2. 根据权利要求 1 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合,其中所述第一分析物阈值和第二分析物阈值是从对一个第一数据集以及一个第二数据集的分析能得到的,所述第一数据集包括所测量的作为受孕后时间的一个函数的多个 hCG 的尿液水平,所述第二数据集包括对于所述测定或测定装置所测量的、作为尿液 hCG 水平的一个函数的多个信号水平。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合,进一步包括对应于一个或多个受孕后时间的一个或多个另外的存储的分析物阈值。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的测定结果阅读器和测定装置的组合,包括具有用于测量处于较低浓度范围内的 hCG 的一个检测区的一个第一测定流动路径以及具有用于测量处于较

高浓度范围内的 hCG 的一个检测区的一个第二测定流动路径,所述测定装置包括在该第一测定检测区上游提供的用于 hCG 的一个可移动的标记结合试剂和用于 hCG 的一个可移动的第二结合试剂以及在该第二测定检测区上游提供的用于 hCG 的一个标记结合试剂。

5. 根据权利要求 4 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合,其中每一个流动路径包含一个单个的检测区。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合,所述测定装置包括一个共享的控制区。

7. 根据权利要求 6 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合,所述测定装置包括用于检测来自两个检测区的光的一个单个的光电检测器以及用于对应地照明共享的参照区、共

享的控制区和所述两个检测区的四个光源。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合, 其中所述参照区被提供在一个检测区的下游。

9. 根据权利要求 4 至 8 中任一项所述的测定结果阅读器和测定装置的组合, 其中一个或两个测定流动路径都包含一种侧向流多孔载体。

10. 根据权利要求 9 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合, 其中该侧向流多孔载体包含硝酸纤维素。

11. 一种用于确定雌性哺乳动物受试者中对受孕后时间长度的一个定量估算的方法, 该方法包括:

a) 将一个怀疑含有 hCG 的受试者尿样施用到一个测定或测定装置中;

b) 借助于所述测定或测定装置测量一种分析物测量信号, 所述分析物测量信号的值取决于 hCG 的水平;

c) 将所述分析物测量信号值与一个最小怀孕阈值 (PDTmin) 进行比较, 其中小于所述最小怀孕阈值的分析物测量信号值表示受试者“未怀孕”并且其中大于所述最小怀孕阈值的分析物测量信号值表示受试者“怀孕”;

d) 将所述分析物测量信号值与对应于受孕后 14 天的一个第一分析物阈值进行比较;

e) 将所述分析物测量信号值与对应于受孕后 21 天的一个第二分析物阈值进行比较;

f) 基于步骤 (c)、(d)、(e) 中的比较对受孕后时间的长度提供一个如下的定量估算:

如果所述分析物测量信号值小于所述第一分析物阈值但大于所述最小怀孕阈值, 则表示 1 到 2 周妊娠;

如果所述分析物测量信号值大于或等于所述第一分析物阈值但小于或等于所述第二分析物阈值, 则表示 2 到 3 周妊娠; 并且

如果所述分析物测量信号值大于所述第二分析物阈值, 则表示 3+ 周妊娠; 并且

其中所述受孕后时间是相对于 LH 峰的日期来定义的, 所述方法包括使用根据权利要求 1 所述的测定结果阅读器和测定装置的组合。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中所述第一分析物阈值和第二分析物阈值是从对一个第一数据集以及一个第二数据集的分析能得到的, 所述第一数据集包括所测量的作为受孕后时间的一个函数的多个 hCG 的尿液水平, 所述第二数据集包括对于所述测定或测定装置所测量的、作为尿液 hCG 水平的一个函数的多个信号水平。

用于测量 hCG 的测定阅读器、装置以及方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于提供受孕后时间的一种测定装置、阅读器、方法以及数据的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 在雌性生殖系统中, 月经周期是生理学变化的一个循环的周期, 并且对于发生在育龄雌性中的生殖是必要的。月经周期是从月经来潮的第一天开始计算, 因为月经的起始与激素周期紧密对应并且因为月经出血对于有关个体是一个容易清楚的事件。可以将月经周期分成几个时期, 并且各时期的长度在女性与女性之间以及周期与周期之间是不同的。这些时期以及它们的平均值典型地是如下: 月经期, 第 1 到 4 天; 卵泡期 (也称为增殖期), 第 5 到 13 天; 排卵期, 第 14 天; 黄体期, 第 15 到 26 天以及缺血期, 第 27 到 28 天。

[0004] 卵泡期是月经周期的一个时期, 在此期间卵泡在卵巢中成熟。通过卵泡刺激素 (FSH) 升高的影响, 约五到七个三级卵泡被招募用于进入下一个月经周期。随着它们成熟, 这些卵泡分泌越来越多量的雌二醇。当该卵已经成熟时, 它分泌足够的雌二醇以触发黄体生成素 (LH) 的急性释放。在该平均周期中, 该“LH 峰”大约在周期的第 12 天开始, 并且可以持续约 48 小时。LH 的释放使卵成熟并且削弱卵巢中的卵泡的壁。这个过程导致排卵。雌激素水平继续增加并且刚好在该 LH 峰开始前处于它们的最高值。大多数原始资料来源赞同在该 LH 峰开始后 24 到 28 小时正常地发生排卵, 典型地在该 LH 峰后约 36 小时。

[0005] 黄体期是月经周期的较后的时期并且以黄体的形成开始并且以妊娠或者黄体溶解而结束。控制这个阶段的主要激素是黄体酮, 在黄体期的过程中它显著地高于该周期的其他时期。卵泡期的长度以及因此月经周期的长度可以在很大程度上变化, 虽然平均是 14 天, 一些女性具有 10 天的卵泡期, 另一些为 16 天。然而, 对于每个女性而言黄体期几乎总是持续相同的天数。在女性体内正常的精子寿命范围是从 1 天到 5 天。最易受精期 (其间性交最可能导致怀孕的时间) 覆盖从排卵前 5 天左右到排卵后 1 到 2 天的时间。在具有 14 天黄体期的平均 28 天的周期中, 这对应于该周期的第二周以及第三周的开始。

[0006] 受孕后, 通过胎盘分泌 β -hCG 并且 β -hCG 向黄体提供信号从而继续分泌黄体酮, 由此维持子宫的厚的内膜 (子宫内膜)。继续分泌 β -hCG 直到胎盘能够分泌它自己的黄体酮。在妊娠前三个月期间约每 2.2 天人体中 hCG 激素水平加倍。如果卵没有受精, 并且因此没有生成 β -hCG, 则黄体停止分泌黄体酮并且退化。没有了黄体酮, 则子宫内膜通过阴道被排出 (月经) 并且月经周期再一次开始了。在妊娠的第一周期间尿中可检出水平的 hCG 开始于 5mIU/ml 并且在 2 到 3 个月升高到 100,000mIU/ml。在第二以及第三个妊娠期的三个月期间这些值下降到 10% 到 15% 的峰浓度。因此, 存在非常广大范围的分析物浓度的值。

[0007] 用于确定尿中 hCG 的水平的简单测定装置对于非处方 (over the counter) 以及专业用途是广泛可获得的。使用这样的装置通过测量激素 β -hCG 的存在或缺乏来确定一位女性是否怀孕。现在, 如果女性在咨询医疗保健专业人士之前怀疑她们可能怀孕了, 她们典型地将购买这种装置。

[0008] 然而, 一旦女性确定或怀疑她怀孕了, 对她而言知道她已怀孕几周是有用的。这也

可以帮助她和医生或助产士计划未来估计婴儿出生的日期,以及对其他关键日期计划一个日程,例如十二周的扫描。典型地医生或助产士将根据从该女性获知的末次月经的第一天(基于标准的 28 天周期)来确定妊娠的程度(extent)。同时已知黄体期相当恒定地为 15 天左右,卵泡期可以从例如 9 天到 28 天之间很大程度上改变。周期长度从一个女性到另一个女性可以很大程度地改变。因此基于她末次月经的第一天确定的妊娠程度在准确度方面可能会在很大程度上变化。此外,这假定的是该女性给出了她末次月经的正确日期。因此仅基于 hCG 的水平医生关于妊娠程度的估计可能是相当不准确的。同时一个典型的 hCG 测定试验可以提供受试者是否怀孕的一个指示,在不要求进一步的确切信息时(例如,末次过期月经的日期),它自身不能提供对妊娠程度的一个进一步的指示。

[0009] 用于测量尿中分析物(例如 hCG)的水平的简单的免疫测定装置是广泛可获得的,例如在 Unipath Clearblue^{RTM}名下出售的。EP291194 中还描述了侧向流免疫测定装置。同时此类装置能够指示高于或低于特定阈值(典型地 10 或 25mIU)的 hCG 的存在或不存在,并且指示一名受试者怀孕或者未怀孕,它们不能在一个延长的分析物范围上(例如,hCG 的水平范围从 10 到 250,000mIU)确定分析物的水平。

[0010] 原则上,有可能使用一种简单的侧向流类型装置在一个延长的范围上测量 hCG 的水平。然而,在缺少有关末次过期月经的日期的信息时,仅指示 hCG 的量(以基于浓度的单位)随医疗保健专业人员仅有有限的用途并且几乎确定对普通用户(lay user)是无用的。

[0011] 已经开发并且商业化了多种侧向流装置(例如 EP291194 所描述的)用于检测流体样品中的多种分析物。此类装置典型地包含一种多孔的载体,该载体包括一种干燥的可移动的标记结合试剂(该试剂能够结合至所讨论的分析物)以及一种固定的结合试剂(它也能够结合至在该标记的结合试剂下游的检测区处提供的分析物)。在检测区处检测的该固定的标记结合提供了在该样品中存在分析物的一个指示。

[0012] 可替代地,当该感兴趣的分析物是一种半抗原时,该免疫测定装置可以使用一种竞争反应,其中一种标记分析物或分析物类似物与该样品中存在的分析物竞争在检测区处的一种固定的结合试剂。可替代地,该测定装置可以使用一种抑制反应,由此将一种固定的分析物或分析物类似物提供在一个检测区处,该测定装置包括用于该分析物的一种可移动的标记结合试剂。

[0013] 当检测分析物时一种夹心免疫测定经常是所选用的测定法。然而,夹心测定并不总是可能的,例如在小分子(例如半抗原)的情况下,这些小分子可能并不足够大至允许两个不同的结合配偶体同时结合至其上。使用一种典型的侧向流装置(使用一种夹心免疫测定)制备的一个剂量反应曲线显示信号的水平随着分析物的逐渐增加而逐渐增加到这样一个点,在比该点更高的分析物水平处,该曲线趋向于一个平台。然而在更高的分析物水平下,由于在检测区优先捕获尚未结合至标记试剂上的分析物该信号开始减小。这种现象称为钩状效应。因此,尤其是如果所要求的是一个定量的或半定量的测定结果时,由于以下事实这些夹心免疫测定展示一个有限的测定范围,即在较高分析物水平下观察的信号量或强度与在较低分析物水平下观察的信号量或强度相比可能相同或甚至更低。

[0014] 一个竞争或抑制测定典型地在零或低的分析物水平下提供一个高信号。在分析物的水平逐渐增加时,取决于与分析物的量相比标记结合种类的量,该信号水平可能仍然是高的。在分析物的水平仍然逐渐增加时,由于未结合的分析物与标记的分析物或分析物类

似物竞争固定结合试剂或者结合至标记结合试剂,降低了该标记结合试剂在该检测区处的结合,信号开始降低。

[0015] 因此,使用夹心测定在延长的范围上测量分析物招致有关钩状效应的问题。高分析物浓度开始产生测定信号的减少。竞争或抑制测定导致在高分析物浓度下测定信号的耗尽并且因此提供一个有限的范围,在该范围上可以对分析物进行测量。

[0016] 因此,以上测定方法并不适合用于在一个延长的分析物范围上测量分析物的水平。

[0017] 已经推荐了多种测定装置来在延长的范围上测量分析物。

[0018] US2004/0197820 披露了流动穿过包括一个检测区的多孔载体测定装置用于减少钩状效应,其中该装置可以包括一个下游校准区。

[0019] US2006/0019404 披露了一种具有一个扩大的动态范围的测定装置,该装置包括一种侧向流试验片条,该试验片条包括对分析物浓度具有逐渐降低的灵敏度的多个检测区。该测定装置可以包含两个载体,每一个载体具有多个检测区。对在该多个检测区处存在的标记/信号的量进行检测以便确定分析物浓度。

[0020] EP462376 披露了一种测定装置,该装置包括一个捕获位点以及一个结合物回收位点,其中该结合物回收位点接收并且结合迁移穿过所述捕获位点的所述结合物或结合物复合物,并且其中对在该结合物回收位点和捕获位点两者处的固定的结合物进行检测以便确定感兴趣的分析物的量。

[0021] 使用一种对于该分析物或分析物类似物可光学检测的标记结合试剂的侧向流类型测定装置是对于简单的一次性测定所选择的测定装置。然而,可以使用很多其他测定装置以及方法来检测分析物。例如,该测定方法可以包含一种用于分析物的结合试剂,该结合试剂是用一种酶、放射性的、电化学活性的或磁性的标记物进行标记的。该分析物可以借助一种酶和一种电化学介体(electrochemical mediator)进行检测。用于检测葡萄糖酶(包括葡萄糖氧化酶)以及一种电子介体(亚铁氰化物/铁氰化物)的简单装置是广泛可商购的。声学生物传感器型的装置以及方法(例如在一个结合事件之后测量一个石英晶体的共振频率)允许对一种分析物进行测定而无需提供一种标记结合试剂。

[0022] 发明概述

[0023] 根据一个第一方面,本发明提供了一种用于确定在一个雌性哺乳动物受试者中对受孕后时间长度的一个定量估算的方法,该方法包括:

[0024] a) 将一个怀疑含有 hCG 的液体样品施用于一个测定或测定装置中;

[0025] b) 借助于所述测定或测定装置测量一种分析物测量信号,该分析物测量信号的值取决于 hCG 的水平;

[0026] c) 将该测量的信号值与一个分析物阈值进行比较,其中所述分析物阈值对应于一个受孕后时间;

[0027] d) 基于步骤(c)中的比较提供对受孕后时间长度的一个定量估算。

[0028] 根据一个第二方面,本发明提供了一种测定结果阅读器,该测定结果阅读器与一种测定或测定装置一起使用而用于计算对在一个雌性哺乳动物受试者中的受孕后时间长度的定量估算,该测定结果阅读器包括:

[0029] a) 对应于一个受孕后时间的一个存储的分析物阈值;

[0030] b) 一种测量装置,该测量值装置用于测量对应于从所述受试者得到的一种液体样品中的 hCG 水平的一种分析物信号值并且将该分析物信号值与该存储的分析物阈值进行比较,由此基于该比较提供对受孕后时间长度的一个定量估算;

[0031] c) 一种用于显示一个受孕后时间的显示装置。

[0032] 在一个第三方面中,本发明提供了一种用于在雌性哺乳动物受试者中提供对一种受孕后逝去的时间长度的定量估算的测定装置,所述测定装置包括:

[0033] a) 一种根据本发明的第二方面的测定结果阅读器;

[0034] b) 一种或多种测定,用于提供取决于一个液体样品中的 hCG 水平的一个信号值。

[0035] 一个分析物阈值对于一个特定类型的测定或测定装置而言可能是唯一的。一个分析物阈值可以是一个信号值,该信号值对应于一个受孕后时间。

[0036] 对于具体的测定或测定装置的一个分析物阈值可以从分析一个第一数据集和一个第二数据集能得到的,该第一数据集包括所测量的作为受孕后时间的一个函数的 hCG 的水平,该第二数据集涉及对于该具体类型的测定或测定装置所测量的、作为 hCG 水平的一个函数的信号水平。

[0037] 该第一数据集是在一群怀孕的雌性哺乳动物受试者中测量随着受孕后时间的推移的 hCG 水平而能得到的。

[0038] 该第二数据集可以包括一个或(优选地)多个数据点。

[0039] 可以将该受孕后时间定义为(例如)关于在受孕之前的月经周期的过程中发生的一个特定的事件。这个事件可以是例如 LH 达到它的最大值或 LH 峰发生、基础体温(BBT)升高发生、FSH 二次升高发生或 P3G(孕二醇-3-葡萄糖苷酸)升高发生时的时间。

[0040] 受孕的时间可以是一个受孕的日期。

[0041] 可以将该受孕的日期定义为例如 LH 峰 +x 天/s 的日期,其中 x 是一个数。

[0042] 在一个第四方面,本发明提供一个数据集在提供对应于一个受孕后时间的一个分析物阈值中用于根据本发明的第一方面的方法中和/或用于根据本发明的第二方面的测定阅读器中和/或用于根据本发明的第三方面的测定装置中的用途,其中该数据集包含从来自一群怀孕的雌性哺乳动物受试者的尿的样品中测量的作为受孕后时间的一个函数的多个 hCG 水平。特别地,可以使用该数据集来衍生出一个或多个阈值,这个或这些阈值被存储或输入一个电子数据处理装置。

[0043] 特别地,该哺乳动物受试者是人类。

[0044] 特别地,该液体样品是尿。

[0045] 该第一数据集可以从测量来自一群怀孕女性收集的尿样的随着时间推移的 hCG 水平而得到,这些女性在她们以前的月经周期中记录了她们的 LH 峰的日期。

[0046] 可以从用一种已知浓度的 hCG 测试一种特定类型的测定或测定装置并且测量对于每个 hCG 水平的这些信号值得到该第二数据集。可以在每一个 hCG 水平下测试多个测定装置以便增加数据点的数目。

[0047] 从这些第一和第二数据集,可以得到一个或多个阈值,这个或这些阈值是对应于一个受孕后时间的信号值。为了增加数据点的数目,如果需要可以生成一个模拟数据集。从该第一和第二数据集和/或从该模拟数据集,可以选择一组统计上优化的阈值从而根据预先选择的受孕后时间分类标准给出最大的临床准确度,例如在一个特定的时间分类范围内

大于 80% 的准确度。

[0048] 由于怀孕的女性之间在 hCG 水平上的天然变异,从该第一数据集在每一个时间点上观察到不同的 hCG 值,该第一数据集在每一个测量时间上都具有一个特定的分布。因此一个选定的分析物阈值代表对于一个特定的数据集得到的一个平均信号值。从一个不同群的女性中得到的一个不同的第一数据集可能导致一个不同的分析物阈值。对阈值进行选择所基于的基础是它们在提供一个受孕后时间方面提供一个最优的临床准确度。

[0049] 为了确定这些阈值的准确度,然后可以使用这个或这些选定的阈值(例如通过将向一个测定装置提供这些存储的阈值)来对从怀孕女性中得到的实际尿样进行分类。如果必要,可以将这些阈值进行精细化(refined)以便优化该分类的临床准确度。

[0050] 该第一数据集的统计分析可以通过例如使用一种指数模型来进行。该第一数据集的统计分析可以例如使用一种四参数逻辑曲线来进行。可以采用其他类型的已知的统计模型来将这些数据建模并且对其进行分析。

[0051] 可以用于确定针对一个测定或测定装置的一个或多个阈值的一种示例性方法描述于以下实例 2 中。实例 2 描述了该方法,使用这种方法将阈值分配到根据实例 1 制备的测定装置中,然而可以容易地将该方法应用于其他类型的测定装置。

[0052] 根据该第一、第二和第三方面的方法、阅读器以及测定装置可以进一步包含指示一个另外的受孕后时间的一个另外的分析物测量阈值。类似地可以使用根据本发明的第四方面的数据集来提供该第二分析物的测量阈值。可以将该另外的分析物阈值存储在该装置或阅读器中。

[0053] 该测定装置或阅读器可以包含两个或更多个(即,三个、四个或五个)对应于各自的受孕后时间周期的存储的分析物阈值。作为提供多个单独的测量阈值的一个替代方案,该整合的测定装置或用于与一个测定装置一起使用的阅读器可以包含一个存储的算法,该算法包括一个数学公式,该数学公式进行计算以拟合有关针对这一等效的测定装置所得到的信号值作为 hCG 水平的一个函数的一个数据集并且因此向任何信号值提供一个受孕后时间。

[0054] 根据该第一、第二和第三方面的方法、阅读器以及测定装置可以进一步包含一个最小妊娠阈值(PDTmin),其中小于该最小妊娠阈值的一个分析物测量信号表示“未怀孕”并且其中大于该最小妊娠阈值的一个分析物测量信号表示“怀孕”。该测定结果可以在时间 $t < \text{FDT}$ 时提供,其中 FTD 是该测定的完全显影时间,即测量该测定所经过的最大时间。

[0055] 可以通过该显示装置提供一个怀孕指示以及一个受孕后时间。

[0056] 可以按数天、数周或数小时的单位来提供受孕后时间或它可以提供一个时间范围,例如受孕后 2 到 3 周或受孕后 10 ± 2 天。

[0057] 该第一分析物阈值可以对应于一个受孕后时间并且一个第二分析物阈值可以对应于一个更迟的受孕后时间。

[0058] 因此,对于小于该第一阈值但大于该最小妊娠阈值的一个分析物信号值,可以指示在一个第一时间范围内的一个受孕后时间,大于该第二阈值的一个分析物信号值可以指示为在一个第三时间范围内的一个受孕后时间,并且大于或等于该第一阈值但小于或等于该第二阈值的一个分析物信号值可以指示为在一个第二时间范围(发生在该第一和第三时间范围之间)内。

[0059] 根据一个实施方案,该测定装置包含分别对应于受孕后 14 天和受孕后 21 天的第一和第二分析物阈值。因此通过该显示器显示的结果可以是例如对于小于该第一分析物阈值但大于该最小妊娠阈值的一个分析物信号值为 1 到 2 周妊娠,对于大于该第二分析物阈值的一个分析物信号值为 3+ 周妊娠以及对于大于或等于该第一阈值但小于或等于该第二阈值的一个分析物信号值为 2 到 3 周妊娠。

[0060] 该最小妊娠阈值可以取决于该测定所要求的灵敏度而选择并且因此例如可以设定为对应于一个 hCG 水平(对应于 5mIU、10mIU、15mIU 或 25mIU 或两者之间的值)。

[0061] 根据一个实施方案,该测定装置或阅读器包含一个存储的最小妊娠阈值(PDTmin)、一个第一分析物阈值(PDTmid)以及一个第二分析物阈值(EPDTmax)。该第一分析物阈值可以对应于受孕后 14 天并且该第二分析物阈值可以对应于受孕后 21 天。对于大于 EPDTmax 的分析物测量信号,测定结果可以在时间 $t < FDT$ 时提供。

[0062] 在一个具体的实施方案中,参考该受孕后时间的记录日期是 LH 峰的时间测定。作为用于根据本发明的装置和方法的一个时间参考,LH 峰的时间测定是特别有用的,因为它恒定地发生在排卵前约 36 小时并且是用于测定排卵时间的相对精确的预测因子。

[0063] 可以将受孕日期定义为 LH 峰 +1 天的日期。

[0064] 作为提供一个受孕后时间的一个替代方案,可以提供一个排卵后时间或剩余的妊娠时间(至分娩的时间)的指示。

[0065] 该显示装置可以通过以任何适当的语言、字体或格对应地显示文字“怀孕”或“未怀孕”而提供一个“怀孕”或“未怀孕”的指示。可替代地,可以通过一个适当的记号或符号例如“+”或“-”提供一个怀孕或未怀孕的指示。

[0066] 由该整合的测定装置给出的结果可能与由医疗保健专业人员给出的结果不同,该保健专业人员是将妊娠基于一个典型的 28 天的周期(基于上次周期的第一天)来计算日期的。

[0067] 因此可以将受孕日期与基于典型的 28 天周期(基于上次周期的第一天)的妊娠日期相关的信息相组合而提供给该测定装置或阅读器。例如这个信息可以被提供于其中提供该整合的测定装置或阅读器的包装上或与该装置一起提供的一个信息单上。

[0068] 典型地,对于由该装置作出的怀孕指示,一个受孕后时间的指示,时间加 2 周则作为医疗保健专业人员如何确定妊娠日期而给出。

[0069] 例如,信息可以如下给出:

	由该测定装置或指令给出的受孕后时间	你的医生将如何基于 28 天周期 确定你的妊娠日期
[0070]	你的结果是怀孕了并且你大致在 1 到 2 周前怀孕	3 到 4 周
	你的结果是怀孕了并且你大致在 2 到 3 周前怀孕	4 到 5 周
	你的结果是怀孕了并且你大致在 3 到 4 周前怀孕	5+ 周

[0071] 代替提供一个受孕后时间或除此之外该测定装置或阅读器可以提供一日期,该日期是医生将基于 28 天周期来确定的妊娠日期。

[0072] 在根据该第一方面的方法中,可以例如通过一台免疫测定实验室分析仪或一个

ELISA 96 孔板确定该测定（通过该方法确定 hCG 水平）。

[0073] 根据本发明的第一和第三方面的测定装置可以方便地包含能够在一个延长的分析物范围上测量 hCG 的一个流动穿过的或侧向流类型的免疫测定。考虑了其他类型的测定，例如一种声学生物传感器免疫测定或一种微流体类型的免疫测定。

[0074] 特别地，该测定是一种侧向流测定。该测定装置可以是单次使用的，即一次性的。

[0075] 由于随着受孕后时间的推移在 hCG 上的增加，其中 hCG 水平在妊娠的第一周以 5mIU/ml 开始并且在 2 到 3 个月上升到 100,000mIU/ml，需要该测定装置需要能够在一个延长的分析物范围上测量 hCG。

[0076] 该测定装置可以包含能够测量 hCG 的一个单个的测定流动路径或在不同浓度范围上各自能够测量 hCG 的两个或更多个测定流动路径。

[0077] 该测定流动路径可以包含一个多孔载体，该载体包括用于检测用于 hCG 分析物的一种标记结合试剂的一个检测区。

[0078] 该测定流动路径可以包含一种可移动的（即当与一种液体样品例如尿接触时可移动）标记结合试剂，该试剂能够被捕获或固定在该检测区处。该标记结合试剂可以在该检测区的上游处提供。该标记结合试剂能以干的状态提供。该检测区可以包含一个固定的结合试剂，该试剂能够固定一种标记结合试剂。

[0079] 术语结合试剂是指一个结合对的一个成员。该结合试剂可以包含能够结合至 hCG 上的一种抗体或一种抗体片段。该分析物 hCG 包含与黄体生成素 (LH)、卵泡刺激素 (FSH) 以及促甲状腺激素 (TSH) 相同的一个 α 亚基和一个对于 hCG 独有的 β 亚基。可以使用对抗该 α 和 β 亚基的抗体以一种夹心免疫测定的形式结合至 hCG 上。

[0080] 除了抗原和抗体结合对成员以外，其他结合对包括例如但不限于生物素和亲和素、碳水化合物和凝集素、互补的核苷酸序列、互补的肽序列、效应物和受体分子、酶的辅因子和酶、酶的抑制剂和酶、一个肽序列和一个对该序列或该整个蛋白特异性的抗体、聚合物酸和碱、染料和蛋白结合物、肽和特异性的蛋白结合物（例如，核糖核酸酶、S-肽以及核糖核酸酶 S-蛋白）等。此外，特异性的结合对可以包括多个成员，这些成员原始的特异性结合成员类似物。

[0081] 当在一种标记结合试剂的背景下使用“标记物”是指任何物质，该物质能够产生一种信号，该信号是通过目测或仪器装置可检出的。适合用于本发明的不同的标记物包括通过化学或物理方式产生信号（例如是光学上可检测的）的标记物。这样的标记物包括酶和底物、色原体、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物、电活性的种类、染料分子、放射性标记物以及颗粒标记物。该分析物自身可能固有地能够生成一种可检出的信号。该标记物可以共价地连接到该结合试剂上。

[0082] 该标记物可以包含一种颗粒，例如金、银、胶体非金属颗粒例如硒或碲、染色的或有颜色的颗粒例如结合一种染料或染料溶胶的一种聚合物颗粒。该染料可以具有任何适合的颜色，例如蓝色。该染料可以是荧光的。可以从可商购的疏水性染料例如 Foron Blue SRP (Sandoz) 和 Resolin Blue BBLs (Bayer) 来制备染料溶胶。可以从一个范围的合成聚合物（例如，聚苯乙烯、聚乙烯基甲苯、聚苯乙烯-丙烯酸以及聚丙烯醛）中选择适合的聚合物标记物。所使用的单体正常地是不溶于水的，并且被乳化在水性表面活性剂中从而形成单体微胶粒，然后将引发剂加入该乳液中来诱导这些单体微胶粒聚合。生成了基本上

球形的聚合物颗粒。根据一个示例性的实施方案,该标记物是一种蓝色聚合物颗粒。

[0083] 术语测定流动路径是指一种基质,该基质能够将一种液体从一个第一位置输送到一个第二位置并且可以是例如一种毛细通道、一种微流体路径或一种多孔载体如一种侧向流动多孔载体。该多孔载体可以包含一种或多种多孔载体物质这种或这些多孔载体物质可以按一个线性或堆叠的安排相重叠或是流体连接的。这些多孔的载体材料可以是相同的或不同的。该第一和第二流动路径可以被提供在多个分离的基质上或它们可以被提供到一个共同的基质上以使得沿着该第一测定的一个流动路径进行输送的液体不能跨过该第二测定的流动路径。例如,可以将该第一和第二测定提供到相同的多孔载体上从而使该第一和第二流动路径彼此隔离。这可以通过例如激光切割该多孔载体的多个部分以便使它为非孔状的,由此分离该第一和第二流动路径来实现。作为又一个另外的替代方案,该第一和第二检测区可以通过基本上并排的安排提供到相同的流动路径上,这样,这两个检测区都不被提供到彼此的下游。

[0084] 特别地,该流动路径可以包含一个侧向流动多孔载体。可以将该测定的标记结合试剂和检测区对应地提供到不同的载体材料上。可以用作用于提供该检测区的多孔载体的适合的材料包括硝酸纤维素、醋酸酯纤维、纤维素或纤维素衍生物、聚酯、聚烯烃或玻璃纤维。该多孔载体可以优选地包含硝酸纤维素。这具有以下优点,即无需预先的化学处理就可以将一种结合试剂牢固地固定。如果该多孔固相材料包含纸,例如需要通过使用例如 CNBr、羰基二咪唑或三氟乙烷磺酰氯进行化学偶联来实现将抗体固定在该第二区中。

[0085] 该测定可以以一种试验片条的形式提供。

[0086] 该测定装置可以包括一个控制区。可以将该控制区提供于该检测区的下游。该测定装置可以进一步包含用于提供在该检测区上游的该控制区的一种标记结合试剂。测量该控制区处的信号指示出该测定试验是否已令人满意地进行,即在该测试装置中存在这些试剂并且在运行该测试的期间它们变为运动的并且已经被沿着该流动路径输送。该控制区还可以指示出该装置中的这些试剂能够进行免疫化学相互作用,从而证实该装置的化学完整性。当在某一温度范围内在干燥的条件下考虑储存和装运该装置时,这是很重要的。典型地可以将该控制区定位于该检测区的下游处。该控制区可以包含用于一种标记结合试剂的固定结合试剂。该标记结合试剂可以是结合至该检测区的相同的结合试剂或者它可以是一种不同的结合试剂。如果该标记抗体是已经用一种鼠杂交瘤衍生的一种抗体时,在该控制区处的固定结合试剂可以是例如一种在一个物种中募集(raised)的抗标记结合试剂的抗物种抗体,例如一种“抗小鼠”抗体。

[0087] 该测定装置或阅读器可以包含一个存储的控制信号阈值(CLT),其中将一个在该控制区测量的信号与该控制阈值进行比较以便指示该测定是否已令人满意地执行。

[0088] 该测定装置或阅读器可以进一步包含一种存储的最小分析物阈值,其中如果该测量信号小于该最小阈值除以一个最小分析物阈值时间时,可以确定该测量信号将不会达到该测量阈值除以该总测定显影时间。这将表示以下情况,即一个液体样品具有一个非常低的或不存在的分析物浓度。在这种情况下,在时间 $t < \text{FDT}$ 时可能提供一个早期阴性指示,即分析物不存在或高于某一最低水平的分析物不存在。

[0089] 该测定装置和阅读器可以包含以下各项的一种或多种:一个中央处理单元(CPU)或微控制器、一个或多个 LED、一个或多个光电检测器、一个电源、以及相关的电路。该电源

可以是一种电池或任何其他适合的电源（例如，一种光电池）。方便地可以将该 CPU 或微控制器进行编程以便从该光电检测器的输出确定信号累积的速度或量并且将其与该控制和测量阈值进行比较。

[0090] 该测定装置和阅读器可以包含一个计时装置，通过该装置测量该测定的时间并且通过该装置确定该测定的测量开始的时间。该计时装置可以例如包含一个样品存在指示装置，以检测液体样品被加入到该装置中的时间，例如能够检测液体样品的存在的一对电极。可替代地，该计时装置可以作为光学检测装置的一个部分而包括在内，其中当由光电检测器测定的液体样品已经到达该测定流动路径的一个特定的区时，则该测定测量的计时开始了。

[0091] 该测定装置和显示器可以进一步包含用于显示该测定的结果的一种显示装置。该显示装置可以进一步显示另外的信息例如一种错误信息、个人细节、时间、日期、以及用于通知使用者该测定已经被测量了多长时间的一个计时器。由该测定所显示的信息可以指示为词语、数字或符号，以任何字体、字母或语言，例如“阳性”、“阴性”、“+”、“-”、“怀孕”、“未怀孕”、“看你的医生”、“重复该测试”。

[0092] 该测定装置和阅读器可以包含用于确定该检测区和控制区存在的标记种类的程度和 / 或量的一个信号检测装置。该信号检测装置可以包含一个光学检测装置，如用于确定存在的标记种类的程度和 / 或量的一个光电检测器。该测定装置可以包括一个或多个光源，如被放置为使得光学照明这些区域的一个 LED。来自该光源的光照亮这些对应的区并且将这些光透射或者反射到一个光电检测器上，该光电检测器记录透射或反射的光的量或强度。在这些区处的标记结合试剂的存在将影响透射或反射的光的量，因此在该光电检测器处测量的光指示该标记结合试剂的存在或它的量。

[0093] 一种适合的光源是 LED。该 LED 的颜色将由该标记结合试剂的颜色来决定。对于一个蓝色标记物，对于该 LED 适合的颜色是红色。可以在一个或多个特定的频率下点亮该 LED 以便照明该测定装置的一个特定的区。从该区将光反射或透射到一个记录电信号的光电检测器上。记录的电信号的数目将取决于该 LED 的操作频率并且因此随着时间的推移一个或多个信号可以被记录下来。这些信号将典型地被表示为 a% 吸光度 (% A)。

[0094] 每个测量区典型地是由单个的 LED 照明的。光电检测器可以检测来自多于一个测量区的光以及因此反射来自多于一个 LED 的光。这可以通过顺序地执行该照明过程来实现从而装置能够知道来自哪个区的光被反射到该光电检测器上。在该测定的持续过程中可以用一个固定的或改变的频率重复该顺序照明过程从而可以监测在每个区处随时间推移的信号水平。

[0095] 该测定装置可以包括用于检测加入流体样品的时间的一种装置。例如，可以监测从一个或多个区域中检测的光的水平的改变以便确定一个流体样品是否以及何时被施用到该装置中。例如当液体样品已经到达一个特定区时，该测定试验的计时可以被自动启动。

[0096] 该测定装置以及阅读器可以包括一种流量控制装置，其中可以使用从一个或多个区检测的光的水平的变化来确定一种流体样品是否以及何时被施用到该装置中并且通过测量一个或多个被测量的区之间的流来确定液体样品沿该装置的流量。可以将流量的确定用作一个进一步的质量控制检查，例如，如果该流量大于或者小于设定水平时该测定可以被拒绝。该计算电路可以响应这些信号以便对于沿该载体流动的流体计算流量，将计算出

的流量与上限和下限进行比较,并且如果计算出的流量在该上下限之外时,则拒绝该测定结果。

[0097] 典型的光学检测和照明系统将包括至少一个光源以及至少一个光电检测器(如一个光电二极管)。优选的光源是发光二极管或LED。可以通过该光电检测器测量反射光和/或透射光。为了本披露的目的,使用反射光是指来自光源的光从该多孔载体或其他液体转运载体被反射到该光电检测器上。在这种情况下,典型地将该检测器提供在该载体的与该光源相同的一侧上。透射光指穿过该载体的光并且典型地将该检测器提供在该载体的与光源相反的一侧上。为了反射率测量的目的,可以为该载体配备一个背板,例如一个白色反光的MYLAR[®]塑料层。因此来自光源的光将落到该载体上,一些将从它的表面被反射并且一些将穿透进入该载体中并且以深达并且包括反射层被提供的深度的任何深度处被反射。因此,一个反射率类型的测量实际上可能涉及穿过该多孔载体的至少某一厚度的光的透射。

[0098] 该测定装置典型地将包括一个或多个孔或窗,通过这个或这些孔或窗光可以从多个照明源中的一个照射到该测定或测定条的一个特定区上。这些窗用于定义光落到一个特定区上的区域并且用于定义该测定或测定条的哪个部分被照明。有待照明的每个区可以具有一个对应的窗。因此,具有四个测量区的装置将具有四个窗。从这些窗反射的光由这个或这些光电检测器收集起来。对于包括一个具有多个区的流动路径的一个测定装置,可以测量该液体样品在这些区之间移动所花费的时间。

[0099] 除了测量这些对应的测定的多个检测区连同多个控制区(当存在时)以外,该光学装置还可以测量一个参照区,即不含干燥状态的结合试剂的流动路径的一个部分。该参照区的目的是提供一个信号值,可以将在检测区处得到的信号值与之进行比较。参照区的测量使得能够测量来自该流动路径的反射或透射光的背景水平。该背景水平可能是由于例如该多孔载体的光学反射、液体样品的存在、或该测定的组分如一个标记的结合试剂的存在。因此可以将在该检测区处测量的光的水平相对于背景光的水平进行校正以便提供一个补偿的信号,该信号指示在该检测区存在的标记结合试剂的量。在该参照区处的测量还可以补偿施用于这些测定装置的流体样品之间的任何变化,例如尿样可以在颜色方面在很大程度上变化。

[0100] 典型地该测定在一段时间内发生,在该时间段内标记结合试剂在测试区和控制区处积聚。对于一个测定试验的一个典型的时间是3分钟。

[0101] 可以周期性地(例如,约一秒钟两次)进行对从每个窗反射的光的测量并且可以使用一个低通数字滤波器来拒绝噪音并且使数据平滑。过滤的值可以被用于检测流并且用于确定测定结果。

[0102] 对于每个窗,可以计算当在该流动路径中该特定的测量区是干的(“校准值”)时(即任何液体样品到达所述区之前)的测量值除以当该测量区是湿的并且可能已经显影出一条线时的测量值的比率。该比率等于该流动路径在反射特性方面改变(作为该液体样品沿着该流动路径通过的结果)后的反射光的比例。例如,当该流动路径包括一个多孔载体(如硝酸纤维素)时,在反射特性方面的改变可能是相当显著的。

[0103] 对于每个窗,在参照窗、控制窗、以及测试窗的窗比率等于当该多孔载体是干的, $t = 0$ (在加入样品之前)时的测量值除以加入样品后在时间 t 时的测量值。

[0104] 对于每个时间点 t ,对于每个窗的窗比率可以如下进行评估:

[0105]

$$\text{参照比率}_t = \frac{\text{过滤的参照窗值}_{\text{时间}=0}}{\text{过滤的参照窗值}_{\text{时间}=t}}$$

[0106]

$$\text{测试比率}_t = \frac{\text{过滤的测试窗值}_{\text{时间}=0}}{\text{过滤的测试窗值}_{\text{时间}=t}}$$

[0107]

$$\text{控制比率}_t = \frac{\text{过滤的控制窗值}_{\text{时间}=0}}{\text{过滤的控制窗值}_{\text{时间}=t}}$$

[0108] 过滤的% A 值的计算

[0109] 对于每个时间点 t, 可以使用参照比率作为用于背景的基线使用这些测试线和控制线的比率计算% A 值, 如果有一条线没有显影, 该背景可能在所有的窗中发生。

[0110]

$$\text{测试}_t (\%A) = \frac{\text{参照比率}_t - \text{测试比率}_t}{\text{参照比率}_t} \times 100\%$$

[0111]

$$\text{控制}_t (\%A) = \frac{\text{参照比率}_t - \text{控制比率}_t}{\text{参照比率}_t} \times 100\%$$

[0112] 该测定装置可以是用于在包括一个检测区的在较低浓度范围内检测分析物的一个高灵敏度 (HS) 测定以及用于在较高浓度范围内检测分析物的低灵敏度检测法 (LS), 该测定装置包括一个测试区、一个参照区以及一个控制区。在 HS 和 LS 区两者测量的信号可以如下定义:

[0113]

$$\text{HS比率}_t = \frac{\text{过滤的HS测试窗值}_{\text{时间}=0}}{\text{过滤的HS测试窗值}_{\text{时间}=t}}$$

[0114]

$$\text{LS比率}_t = \frac{\text{过滤的LS测试窗值}_{\text{时间}=0}}{\text{过滤的LS测试窗值}_{\text{时间}=t}}$$

[0115] 对于 HS 和 LS 区过滤的% A 值可以如下定义:

[0116]

$$\text{HS}_t (\%A) = \frac{\text{参照比率}_t - \text{HS测试比率}_t}{\text{参照比率}_t} \times 100\%$$

[0117]

$$\text{LS}_t (\%A) = \frac{\text{参照比率}_t - \text{LS测试比率}_t}{\text{参照比率}_t} \times 100\%$$

[0118] 典型地这些% A 值应该是在完全测定显影时间时得到的那些值, 虽然这些值可能在时间 $t < \text{FDT}$ 时被确定。

[0119] 通过该参照窗比率与所考虑的(控制或测试窗)窗比率的差除以该参照窗比率并

且乘以 100% 给出了归一化的百分比相对衰减 (% A)。

[0120] 可以将控制和测量信号值表示为 % A, 即对于在一个参照区测量的信号的信号值。

[0121] 可替代地, 这些信号值可以被表示为 % R, 即一个绝对值。

[0122] 流检测和确认

[0123] 流检测

[0124] 可以使用对于每个窗的窗比率来检测流体经过该窗的流。当该比率已经通过流检测阈值百分比 (FDT%) 下降时, 则将流分类为已经达到一个窗。这对应于过滤值以相同的比例超过它的校准值的一个增加。

[0125] 对于时间 t , 窗比率 $\geq \frac{1}{1 + \text{FDT}\%}$

[0126] 或 $\frac{\text{过滤值}_{\text{时间}=t}}{\text{过滤值}_{\text{时间}=0}} \geq 1 + \text{FDT}\%$

[0127] 当该标准被第一次满足时记录对于每个窗的时间用于流确认。

[0128] 流确认

[0129] 可以将对应于流的不同参数存储在该测定装置或阅读器中并且用于将沿着一个测定装置的多孔载体的液体样品流进行分类。该装置或阅读器可以显示流中的任何错误。

[0130] 该测定装置或阅读器可以包含一个或多个存储的值, 这些值对应于一个最小流检测时间 ($\text{FDT}_{\min}$)、一个最大流检测时间 ($\text{FDT}_{\max}$)、一个最小窗转换时间 ($\text{MTT}_{\min}$) 以及一个流检测阈值 (FDTh)。

[0131] 该测定装置或阅读器可以包含一个或多个另外的存储的值, 如该测定的一个完全测定显影时间 (FDT)、一个最小测定显影时间 (MDT)、以及一个早孕最大决定阈值 (EPDTmax)。

[0132] 只有在一个最小测定显影时间 (MDT) 已经过去之后, 才可以提供测定结果。MDT 可以是零。

[0133] 可以将一个存储的阈值或值永久地或暂时地存储在该装置或阅读器中。可以从一个外部装置将它输入该装置或阅读器中。

[0134] 该测定装置可以包括与该流动路径流体连接的并且在其上游的一个多孔样品接收器。该测定装置可以包括多于一个测定流动路径 (各自包含一个检测区), 在这种情况下可以提供单个的多孔样品接收器, 它对多个测定流动路径是公用的。因此, 施用于该装置的多孔样品接收器的流体样品能够沿着这些对应的测定的多个流动路径移动到这些对应的检测区。该多孔样品接收器可以被提供于一个壳体中或者可以至少部分地向外延伸出所述壳体并且可以例如用于收集尿流。该多孔样品接收器可以充当一个流体储存器。该多孔样品接收构件可以由能够快速吸收液体的任何吸收性的、多孔的或纤维材料制成。这些材料的多孔性可以是单向的 (即其中的孔或纤维全部地或主要地平行于该构件的一个轴而运行) 或多向的 (全方向的, 这样该构件具有一种无定形的海绵状结构)。可以使用多孔塑料材料, 例如聚丙烯、聚乙烯 (优选非常高分子量的)、聚偏二氟乙烯、乙烯乙酸乙烯酯、丙烯腈和聚四氟乙烯。其他适合的材料包括玻璃纤维。

[0135] 如果希望的话, 可以将一个吸收“池”提供在该载体材料的远端。该吸收池可以包含例如 Whatman 3MM 层析纸, 并且应该提供足够的吸收能力以便允许将任何未结合的标记

结合试剂洗涤出该检测区。作为这样一个池的一个替代方案,所具有的多孔固相材料的长度延伸超过该检测区的就会是足够的。

[0136] 将一个结合试剂施用到一个检测区后,可以对剩余的多孔固相材料进行处理以便封闭任何剩余的结合位点。通过例如用蛋白(例如,牛血清白蛋白或乳蛋白)或用聚乙烯醇或乙醇胺或它们的组合进行处理可以实现封闭。当用该样品润湿该多孔载体时,为了协助该标记结合试剂的自由移动,该多孔载体可以进一步包含一种糖(如蔗糖或乳糖)和/或其他物质如聚乙烯醇(PVA)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。可以将这样的材料例如作为一种水性溶液置于有待施用该标记结合试剂的区域中。可以将这样的材料作为第一应用而施用至该多孔载体,随后应用标记物,可替代地可以将这样的材料与该标记物进行混合并且施用至该多孔载体,或这两者的组合。可以将这样的材料置于该标记结合试剂的上游或置于其上。

[0137] 可替代地,在制造的时刻可能不封闭该多孔载体,而是将用于封闭该多孔载体的试剂(means)包括在该多孔载体上游的一种材料中。当润湿该试验片条时,将用于封闭该多孔载体的试剂固定并且该封闭试剂流动进入并且穿过该多孔载体,随着流的前进而进行封闭。该封闭试剂包括多种蛋白例如BSA和酪蛋白以及多种聚合物如PVP、PVA以及多种糖以及多种洗涤剂例如Triton-X100。该封闭试剂可以存在于大孔载体材料中。

[0138] 硝酸纤维素多孔载体可以具有至少约1微米,例如大于约5微米,并且例如约8到12微米的孔径。

[0139] 可以例如用一种塑料薄片支持该硝酸纤维素多孔载体从而增加它的处理强度。这可以通过在背材例如Mylar™的薄片上形成一个硝酸纤维素的薄层而容易地制造。

[0140] 可以将干燥的结合试剂提供到一个多孔载体材料上,该载体材料被提供在一个包括该检测区的多孔载体材料的上游。该上游多孔载体材料可以是孔的。该大孔载体材料应该是低蛋白结合的或无蛋白结合的,或应该由多种试剂(例如BSA或PVA)可容易地进行封闭从而在用该液体样品润湿该大孔本体后将非特异性结合减少到最小并且从而有助于该标记试剂的自由移动。如果必要,可以用一种表面活性剂或溶剂预先处理该大孔载体材料以便使它更亲水并且促进该液体样品的快速摄入。用于一种大孔载体的适合的材料包括塑料材料(如聚乙烯和聚丙烯)或其他材料(如纸或玻璃纤维)。在用一种可检出的颗粒标记该标记结合试剂的情况下,该大孔本体可以具有一个比该颗粒标记物的最大粒径大至少十倍的孔径。更大的孔径给予更好的标记试剂的释放。作为对一个大孔载体的一个替代方案,可以将该标记结合试剂提供到一个无孔基质(提供于该检测区的上游)上,所述无孔基质形成该流动路径的一部分。

[0141] 该多孔载体可以包含一个玻璃纤维大孔载体(提供在一个硝酸纤维素多孔载体的上游)并且在它的远端与之重叠。

[0142] 典型地该测定装置包括一个含有一个或多个测定的壳体。该壳体可以是流体不可渗透的并且由一种适合的塑料材料(如ABS)构成。该测定可以进一步包括一个用于接收流体样品的样品接收构件。该样品接收构件可以从该壳体延伸。

[0143] 该壳体可以由一种流体不可渗透的材料构成。该壳体还可以令人希望地排除环境光。如果入射到该装置的外部上的可见光少于10%(优选地少于5%,并且最优选地少于1%)穿透进入该装置的内部,将认为该壳体或外壳基本上排除了环境光。一种不透光的合

成塑料材料如聚碳酸酯、ABS、聚苯乙烯 (polystyrene)、聚苯乙烯 (polystyrol)、高密度聚乙烯或含有适当的挡光颜料的聚丙烯是用于制造该壳体的适合的选择。可以在该壳体的外部提供一个孔,该孔与提供在该壳体中的内部空间内的测定相联通。可替代地,该孔可以用于允许使一个多孔样品接收器从该壳体延伸到该壳体外部的一个位置。

[0144] 包括两个或更多个测定的一个测定装置可以具有一个共享的参照区,其中使用对于一个测定在参照区得到的信号值来补偿对于其他测定在检测区得到的信号值。像这样,该参照区在两个测定之间是“共享的”。

[0145] 包括两个或更多个测定的一种测定装置可以具有一个共享的控制区,其中在一个测定的控制区测量的信号提供了一个值或指示:即对于该测定以及对于其他测定该测试已经被正确地(或不正确地)执行。例如,如果该控制区指示对于一个测定该测试已经被正确地执行,该测定装置所作出的决定是该测试已经在其他测定被正确地执行。因此,可以认为该控制区在该测定装置的多个测定之间被“共享”了。

[0146] 一个测定装置可以包括一个共享的控制区和一个共享的参照区。

[0147] 该测定装置可以进一步包括一个或多个测量溢出参数 (measurement overflow parameter),其中如果这些参数的任何一个大于或大大低于已经被预期的一个值时,将拒绝该结果。这使该测定装置能够拒绝例如硬件故障,如电路板中的中断或短路、电池耗尽 (flat battery)、光学窗口堵塞、LED 失效等。

[0148] 该测定装置可以例如包括两个或更多个流动路径,每一个流动路径包含一个用于检测 hCG 的检测区。

[0149] 存在多种不同的方法使一种测定装置能够在一个延长的范围上测量 hCG 分析物。可以将该测定装置提供为例如一个“梯子 (ladder)”或“溢出 (spill-over)”测定的形式,其中未固定在一个第一检测区的任何一种标记结合试剂前进到一个第二下游检测区。这些对应的检测区可以包含多种固定结合试剂,这些试剂对于一种标记结合试剂-分析物复合物具有不同的结合亲和力。

[0150] 该测定装置可以包含能够在较低分析物范围内测量 hCG 的一个高灵敏度的第一测定以及能够在较高分析物范围内测量 hCG 的一个低灵敏度测定。

[0151] 为了在较高分析物范围内测量 hCG,例如该测定装置可以包含用于该分析物的一个标记结合试剂以及用于该分析物的一个第二结合试剂,提供在该检测区的上游。该第二结合试剂被用于去除过量的分析物并且降低该测定的灵敏度。这具有增加在较高分析物水平下该测定能够测量的动态范围的作用。该第二结合试剂可以是固定的、移动的或两者兼有。可以将该第二结合试剂提供在与该可移动标记试剂相同的多孔载体的区域或者提供在它的上游或它的下游。该第二结合试剂可以结合至与该可移动标记试剂相同的分析物的结合区域或者结合至与该标记结合试剂不同的分析物的区域。该第二试剂可以具有与该第二测定的可移动标记结合试剂不同的对于分析物的亲和力。在一个示例性的实施方案中,该第二结合试剂与该第二测定的可移动的结合试剂相比具有对该分析物更高的亲和力。可以改变第二结合试剂的量以改变该测定对分析物浓度的灵敏度。由于以下事实,增加存在的第二结合试剂的量降低了该测定的灵敏度,即该第二结合试剂能够结合更多的分析物,从而有效地降低了能够结合至该检测区上的标记结合试剂的比例。

[0152] 为了增加该测定的动态范围,该测定装置可以例如包含多个检测区,其中每个检

测区能够结合在不同分析物浓度水平下的分析物。例如,这些对应的区可以包含用于该分析物的、具有一个对该分析物不同的亲和力的结合试剂。

[0153] 增加该测定的动态范围的其他的方法是提供一种测定装置,该装置包括一种夹心结合测定以及一种竞争或抑制测定。例如,该夹心测定可以是高灵敏度测定,即它能够在较低浓度范围下测量分析物并且该抑制或竞争测定可以是一种低灵敏度测定,即它能够在较高浓度范围下测量分析物。一种另外的方法是改变位于该检测区的标记结合试剂或固定试剂的亲和力或量。一种高亲和力结合试剂将具有比一种较低的亲和力结合试剂更高的分析物灵敏度。类似地,低浓度的结合试剂将具有比高浓度的结合试剂更低的分析物灵敏度。可以通过改变结合试剂与该标记结合试剂的标记的比率来改变测定灵敏度。如果将一种颗粒用作标记物,则可以改变施用于该标记物的结合试剂的量以改变测定灵敏度。操纵一个测定的灵敏度的一种另外的方法是改变用于该测定的标记物的量。例如,可以通过降低结合试剂与用于该标记结合试剂的标记种类的比率来降低一个测定的灵敏度。

[0154] 操纵一个测定的灵敏度的一种另外的方法是改变一个标记物的光密度。可以通过使用一种具有低放热光密度的标记物降低测定灵敏度。这可以例如通过提供具有一个低浓度的染料的聚合物颗粒标记物或通过使用一种具有对一种光电检测器更不敏感的有颜色的标记物来实现。

[0155] 测量高分析物水平的又另一种方法是使用一种非颗粒标记结合试剂。当通过一个夹心结合测定来测量高水平的分析物时可能要求高水平的结合试剂。在其中该标记物是一种颗粒标记物的情况下,在该多孔载体之内或其上提供高水平的分析物可以产生位阻从而导致差的测定灵敏度。相反地,在较低的分析物水平下,使用一种非颗粒标记结合试剂可能由于低的光密度而产生一种低的信号。然而,在高分析物水平下,非颗粒标记物能以足够高的水平存在以易于检测。一种光学可检测的非颗粒标记物的一个例子可以是一种染料。该染料可以是荧光的。

[0156] 测定灵敏度可以受该多孔载体的流量所影响。降低该测定的灵敏度的一种方法是采用一种具有较高流量的多孔载体(如硝酸纤维素)。

[0157] 一个测定的灵敏度可以通过改变速率而进行进一步操纵,在该速率下该标记结合试剂从它的起始地点被释放。降低分析物灵敏度的一种另外的方法是在与液体样品接触期间提供该标记结合试剂从该多孔载体的快速释放。可以通过在该装置中提供糖、蛋白或其他聚合物物质例如甲基纤维素来改变该标记结合试剂的释放。

[0158] 在诸位发明人对在一个延长的分析物范围上测量 hCG 进行研究的过程中,他们构建了多种不同的装置,这些装置包括多种根据现有技术的装置。他们发现同时此类装置中有多种被发现在测量分析物上是令人满意的,它们对于在一个延长的分析物范围上测量分析物水平(足够充分精确以满足法规要求以便使该装置适合用于商业目的)的能力方面受到许多限制。本发明的发明人已经表明,对于其中检测一种分析物的多个检测区提供在相同的多孔载体上的多种测定装置,在一个上游检测区处的结合可以改变在一个下游检测区处的结合特性,并且在一个上游检测区处的结合上的任何改变可以引起在下游检测区处的结合的一种复合改变。这在较高分析物浓度水平下尤其如此并且可以引起差的测定精度。此外,已经发现在运行该测试期间在这些检测区中存在的对应的结合试剂之间可以发生交叉结合,并且在制造这些装置期间并且当同时将它们以干燥状态存储时也观察到交叉

结合。这显示出对测定精度和灵敏度的水平具有影响。以前在现有技术中这些问题似乎没有被认识到。

[0159] 根据一个实施方案,该测定装置包含一个第一测定和一个第二测定,其中用于确定 hCG 分析物的该第一测定包含一个第一流动路径,该第一流动路径具有能够固定一种标记的抗 hCG 结合试剂的一个单独的检测区,并且用于所述分析物的该第二测定包含一个第二流动路径,该第二流动路径具有一个能够固定一种标记的抗 hCG 结合试剂的一个单独的检测区,其中在这些检测区处存在的该标记的结合试剂提供了在所述液体样品中 hCG 分析物的存在和 / 或程度的一个指示。

[0160] 该第一测定可以提供在一个第一浓度范围内 hCG 分析物的水平的一个指示,并且该第二测定可以提供在一个第二浓度范围内 hCG 分析物的水平的一个指示。

[0161] 该第一和第二浓度范围彼此不同。该第一和第二浓度范围可以重叠从而提供一个连续的浓度范围。

[0162] 该第一和第二测定可以独立地或者一起提供在某一浓度范围内 hCG 分析物的水平的一个指示。

[0163] 作为在一个单一的测定装置中提供该第一和第二测定的一个替代方案,这些测定可以作为分离的测定装置而提供,当来自这些对应的装置的结果一起获得时能够提供对分析物的水平的一个指示或测量。

[0164] 该液体样品可以选自血液、血清、血浆和尿。特别地,该样品是尿。

[0165] 可以使用本发明的整合测定装置在一个延长的浓度范围上测量 hCG 的程度或存在。该范围可以在从约 10mIU 至约 250,000mIU 之间变化。

[0166] 在一个进一步的实施方案中,该整合测定装置包括两个多孔载体,每一个多孔载体具有一个单一的检测区,该装置包括一个共享的参照区和一个共享的控制区,其中该测定装置进一步包括被安排为用于接收来自这四个区的光的一个单一的光电检测器以及四个发光二极管。

[0167] 特别地,该测定装置包含两个测定,一个高灵敏度测定,即该测定对处于低分析物浓度下的分析物的水平敏感,以及一个低灵敏度测定,即该测定对处于较高分析物浓度下的分析物敏感。

[0168] 在一个具体的实施方案中,该测定装置包含一个第一测定流动路径(该路径包括一个提供在一个检测区上游的用于 hCG 的可移动的标记结合试剂)和一个第二测定流动路径(该路径包括一个用于 hCG 的可移动的标记结合试剂)以及一个提供在一个检测区上游的用于 hCG 的第二结合试剂。可以将该第二标记结合试剂提供在与该标记结合试剂相同的区域中或与之邻近。该第二结合试剂可以是固定的或可移动的。在一个实施方案中,该第二结合试剂是可移动的。该第二结合试剂可以结合至与该可移动标记试剂相比该分析物的相同结合区域或者与该标记结合试剂相比结合至该分析物的不同区域。特别地,该第二结合试剂能够结合至 hCG 的 β 亚基上,并且该可移动的标记结合试剂能够结合至该 hCG 的 α 亚基上。可以改变第二结合试剂的量以便改变该测定的灵敏度。

[0169] 根据一个实施方案,该测定装置包含两个测定测试条,每一个具有一个检测区。一个共享控制区被提供在一个测定条上并且一个共享参照区被提供到另一个测定条上。使用对于一个测定在该参照区处得到的该信号的值来补偿对于另一个测定在该检测区处得到

的信号的值。像这样,该参照区在两个测定之间是“共享的”。

[0170] 共享的参照区和 / 或控制区的提供减少了该测定装置需要的光学部件的数量,因为每一个参照区和 / 或控制区将需要一个照明源,如一个 LED。

[0171] 通过使用一个共享的参照区和 / 或控制区,该测定装置可以减少需要进行检测的区的数目以及由此减少需要采用的光学部件的数目。当该第一和第二测定的测定构造相似时或如果该参照区和 / 或控制区被提供在一个或多个附属的流动路径上当这个或这些附属流动路径的测定构造与该第一和第二测定相似时,使用共享区是最有效的。对于每一个测定使用相同的液体样品也是有利的。这可以通过提供一个共同的点样区而方便地实现,该点样区与两个测定处于流体联通。因此通过该共同的点样区施用于该装置的单一的液体样品可以流动穿过该第一和第二测定两者。在其中该第一和第二测定不等同的情况下,只要在每个测定下将要检测到的光的背景水平是彼此足够相似的,提供一个共享的参照区可能是可接受的。

[0172] 该共享的参照区可以作为该第一或者第二测定的一部分被包含在内。可替代地,可以将该参照区提供在一个通往该第一和第二测定的附属的流动路径上。该参照区可以选自不对应于一个检测区的该流动路径的一个部分或当一个干燥的标记试剂存在于该检测区的上游时不对应于干燥的标记试剂所存在之处的一个部分。

[0173] 在一个实施方案中该测定装置包含一个第一高灵敏度分析物测定(包括一个共享参照区)和一个第二低灵敏度分析物测定(包括一个共享的控制区)。该低灵敏度测定可以包含比该较高的灵敏度测定更高量的标记结合试剂。该高灵敏度测定可以包含一个流动路径,该流动路径包括一个用于提供在一个检测区上游的 hCG 的标记结合试剂,并且一个低灵敏度测定可以包含一个用于 hCG 的标记结合试剂和一个提供在一个检测区上游的用于 hCG 的第二结合试剂。

[0174] 该参照区可以被提供在该检测区的下游或上游。参照区的测量使得能够测量来自该流动路径的反射或透射光的背景水平。该背景水平可能是由于例如该多孔载体的光学反射,液体样品或该测定的多种组分(如一种标记的结合试剂)的存在。因此可以将该检测区处测量的光的水平相对于背景光的水平进行校正以便提供一个补偿的信号,该信号指示在该检测区存在的标记结合试剂的量。在该参照区处的测量还补偿用于这些测定装置的流体样品之间的任何改变,例如尿样可以在颜色方面很大程度上改变。使用对于一个测定在该参照区处得到的该信号的值来补偿对于另一个测定在该检测区处得到的信号的值。像这样,该参照区在两个测定之间是“共享的”。共享的参照区的提供减少了该测定装置需要的光学部件的数目,因为每一个参照区将要求一个照明源,如一个 LED。

[0175] 该测定装置可以包含多于两个测定,例如三个、四个或五个测定,其中该装置具有一个或多个共享的参照区。

[0176] 通过参考以下附图对本发明的多个方面进行了进一步的说明:

[0177] 图 1 显示了在一个典型的 28 天月经周期期间发生的激素水平和基础体温的变化。

[0178] 图 2(a) 和 (b) 显示了本发明的一个示例性的测定装置。

[0179] 图 3 显示了根据本发明的一个实施方案的一个示例性的测定装置。

[0180] 图 4 显示了用于确定针对一个测定装置的流量的一个示例性的算法,该测定装置包括一个高灵敏度 (HS) 测定和一个低灵敏度 (LS) 测定。

[0181] 图 5 显示了针对一个测定装置用于确定受孕后时间的一个示例性的算法,该测定装置包括一个高灵敏度 (HS) 测定和一个低灵敏度 (LS) 测定。

[0182] 图 6(a)-(c) 显示了对于一个测定装置以及用于检测 hCG 的方法得到的典型的 % A 对比测定时间的曲线。

[0183] 图 7 显示了根据实例 2 的针对一群女性所得到的以受孕后时间对 $\log(hCG+0.1)$ 绘制的曲线图以及一个拟合的指数曲线。

[0184] 图 8(a) 和 (b) 显示了对于根据实例 1 制备的高灵敏度测定和低灵敏度测定拟合的和所观察到的关系。

[0185] 附图详细说明

[0186] 图 2a 显示了本发明的一个示例性的测定装置。该装置是长形的,具有长度约 14cm 和宽度约 25mm,该装置包括壳体 50、一个多孔样品接收器 51 和一个用于显示该测定的结果的 LCD 显示器 53。在该测定中还提供的并且未显示的是多个测定流动路径、光学装置、一个光源和相关的电子部件。该测定装置还可以具有一个安装在该多孔样品接收器上的可移开的盖 52。

[0187] 图 2b 显示了根据本发明的一个示例性的测定装置,该装置被打开以显示一些部件。该装置包括上壳体 510、512,一个用于保持该装置中低湿度水平的干燥剂片 513、一个电池 516、一个光学挡板 514 和计算机芯片 515。

[0188] 图 3 显示了根据一个具有一个共享控制区和参照区的示例性实施方案的一个测定装置的单独的测定多孔载体的布局。测定装置 60 具有一个共同的点样区 61,该点样区流体地连接了第一和第二测定 62 和 63。区 64 和 65 分别对应于用于该测定的一个检测区和控制区。区 66 和 67 分别对应于一个检测区和参照区。

[0189] 图 4 显示了针对一个测定装置用于确定流量的一个示例性的算法,该测定装置包括一个高灵敏度 HS 测定和一个低灵敏度 LS 测定。

[0190] 一旦校准完成,对所有的窗口进行测量并且过滤。

[0191] 最小流检测时间 (Min FDT) 可以被定义为流将达到一个或多个测量区的最小的时间。如果在低于该最小流检测时间的时间处检测到流,可以假定该装置已“唤醒”地太迟并且任何校准值都可能被校准期间在窗口中已经存在的流所影响。这些装置可以被归类为“迟唤醒错误”。

[0192] 最大流检测时间 (Max FDT) 可以被定义为一个时间,在液体样品已经被施用于该装置之后或在施用液体样品后该装置已经被激活之后通过该时间液体样品到达所有测量区。如果从唤醒到该最大时间之前在所有检测区中没有检测到流,则该装置被假定处于取样不足 (under sampled),即没有将足够的液体样品施用至该测定装置。这些装置可以被分类为处于取样不足。

[0193] 最小窗口转换时间 (Min WTT) 可以被定义为流体经过一个区和下游区之间的最小时间。在对应于这些区的窗口之间的流必须存在一个最小时间差。少于这个时间的流时间可以被拒绝,因为很有可能该装置已经溢流或取样过量。

[0194] 以下是可以采用的流量参数的一个实例:

[0195] 参数	值
[0196] 最小流检测时间 (Min FDT)	3 秒

[0197] 最大流检测时间 (Max FDT) 64 秒

[0198] 最小窗口转换时间 (Min WTT) 2 秒

[0199] 图 5 显示了针对一个在延长的分析物范围上确定 hCG 的测定装置用于确定受孕后时间的一种示例性算法,该测定装置包括一个高灵敏度 (HS) 测定和一个低灵敏度 (LS) 测定,这两个测定各自包括一个测试区。

[0200] 对于该测定的计时是从流过该高灵敏度测试线窗口的检测点开始的。该算法提供了一个“怀孕”的早期指示,早于该完全测定测试时间。在该完全测定测试时间处(完全测定显影时间)给出受孕后时间或“未怀孕”的指示。

[0201] 一旦该最小显影时间后已经通过该流算法参数将该流确定为有效,如果 $HSt(\% A)$ 超过早孕决定阈值并且 $Ctrlt(\% A)$ 超过该控制线阈值,则显示怀孕的结果。

[0202] 在显示最小显影时间和怀孕之后,随后如果 $LSt(\% A)$ 超过该早孕最大决定阈值,则显示对于该最大时间(+3 周)的受孕指导指示。

[0203] 处于完全测定显影时间

[0204] 如果到这一时间已经显示怀孕,则没有对控制线进行测试。否则,如果该控制线低于该控制线阈值,则显示“装置错误”并且完成测试。

[0205] 如果 $HSt(\% A)$ 超过怀孕中间决定阈值,则显示对于该中间时间的受孕指导指示(2-3 周)并且完成测试。

[0206] 如果到这一时间内已经显示怀孕则显示对于该最小时间(1-2 周)的受孕指导指示并且完成测试。如果 $HS_t(\% A)$ 超过该怀孕最小决定阈值(PDTmin),则显示怀孕和对于该最小时间的受孕指导指示并且完成测试。

[0207] 否则显示未怀孕并且完成测试。

[0208] 对于一个用于检测 hCG 的测定装置,可能采用的具体决定算法参数的一个实例如下

参数	值
[0210] 控制线阈值 (CLT)	30% A
[0211] 最小显影时间 (MDT)	60 秒
[0212] 早孕决定阈值 (EPDT)	14% A
[0213] 早孕最大决定阈值 (EPDTmax)	45% A
[0214] 完全测定显影时间 (FDT)	150 秒
[0215] 怀孕中间决定阈值 (PDTmid)	25% A
[0216] 怀孕最小决定阈值 (PDTmin)	9% A

[0217] 特别地,根据实例 1 的这些决定算法参数可以被用于该装置中用于检测 hCG。特别地,这些决定算法参数可以被用于包括如图 3 中所说明的一个共享参照区和控制区的测定装置中。

[0218] 图 6(a)-(c) 显示了当根据实例 2 的测试用测定装置对于尿中不同水平的 hCG 具有根据图 3 的一个共享的控制区和参照线时所得到的 % A 对比时间 (s) 的一个典型的信号曲线。图 6(a)-(c) 是指用分别含有 0、100 和 2000mIU hCG 的缓冲液进行测试的测定装置。

[0219] 参考以下实例可以对本发明进行进一步表征。

[0220] 实例 1:

[0221] 制备一种用于在一个延长的分析物范围上确定 hCG 的、包括一个低灵敏度测定和一个高灵敏度测定的测定装置

[0222] 制备了用于确定 hCG 分析物的高灵敏度测定,该高灵敏度测定包括提供在一个检测区上游的一个玻璃纤维多孔载体上的一个用于 hCG 的可移动的标记结合试剂以及提供在一个硝酸纤维素多孔载体上的一个控制区。该检测区包含用于 hCG 的固定结合试剂。

[0223] 通过将处于 PBSA 缓冲剂中的浓度为 3mg/ml 的一条线的抗 β -hCG 抗体(内部克隆(in-house clone)3468)以 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 的速率分配到具有的孔径为 8 微米并且厚度在 90 微米到 100 微米之间的尺寸为 350mm(长度) x 40mm(宽度)的硝酸纤维素(Whatman)条带上来制备检测区,该条带已经被叠层到一个 175 微米的背衬层上。使用 Biodot xyz3050 分配平台作为宽度约 1.2mm 长度约 300mm 的一条线将该抗 β -hCG 抗体施用到沿该硝酸纤维素的长度在 10mm 的位置处。

[0224] 使用一台 Biodot XYZ3050 分配平台将在 PBSA 缓冲剂中的 2mg/ml 山羊抗兔抗体(Lampire)以 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 在该检测区的下游 3mm、在 13mm 的位置处标绘于硝酸纤维素上以制备控制区。

[0225] 用设定为 55°C 和速度 5(单程)的 Hedinair 干燥烘箱系列 #17494 将 NC 的这些条带进行干燥。然后使用包含一种混合物(5%乙醇(BDH Analar 104766P)加 150mM 氯化钠(BDH Analar 10241AP)加 50mM 氨基丁三醇碱(来自 Sigma T 1503)加吐温 20(Sigma P 1379)和 1%(w/v)聚乙烯醇(PVA, Sigma 360627))的一种封闭缓冲剂将该 NC 进行封闭。以 $1.75\mu\text{l}/\text{mm}$ 的速率将该封闭缓冲剂施用到该条带的近端。一旦封闭溶液已经浸透到该膜中,则使用相同的装置以 $1.6\mu\text{l}/\text{mm}$ 的速率施用 2%(w/v)蔗糖(Sigma S8501 在去离子水中)的溶液并且允许浸透入该硝酸纤维素膜中,持续约 5 分钟。然后用设定为 75°C 和速度 5(单程)的一个 Hedinair 干燥烘箱系列 #17494 将 NC 的这些条带进行干燥。

[0226] 制备用于 hCG 的标记的结合试剂

[0227] 根据以下实验方案制备标记的结合试剂:

[0228] 用抗 α hCG 包被胶乳颗粒

[0229] 1. 用 100mM pH 8.5 的四硼酸二钠缓冲剂(BDH AnalaR 102676G)(DTB)将来自 Duke Scientific 的蓝色胶乳颗粒(直径 400nm, DB 1040CB, 10%固体(w/v)到 2%固体(w/v))进行稀释。

[0230] 2. 通过在一台 Heraeus Biofuge 17RS 离心机将在两个 Eppendorf 离心管中的体积为 2ml 的稀释的胶乳在 17000rpm(25,848rcf)下离心 10 分钟以洗涤该稀释的胶乳。取出并且弃去上清液并且将沉淀物再悬浮于 100mM DTB 中以在总体积 1ml 中给出 4%的固体(w/v)。

[0231] 3. 制备乙醇和乙酸钠的一种混合物(95%乙醇 BDH AnalaR 104766P 和 5% w/v 乙酸钠 Sigma S-2889)

[0232] 4. 将 $100\mu\text{l}$ 的乙醇-乙酸钠溶液加入到步骤 2 中的洗涤的胶乳中(这是 10%的胶乳的体积)。

[0233] 5. 稀释该储备抗体(内部克隆 3299)以给出在 DTB 中的约 $1200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗体。

[0234] 6. 在设定为 41.5°C 的水浴中将来自步骤 5 的体积为 1ml 的稀释的抗体进行加热,持续约 2 分钟。同样在相同的水浴中将来自步骤 4 的洗涤的胶乳加乙醇-乙酸钠进行加热,

持续 2 分钟。

[0235] 7. 将稀释的抗体加入该胶乳加乙醇-乙酸盐中,在设定在 41.5℃下的水浴中均匀混合并且孵育 1 小时同时使用一台磁搅拌器和一个置于该混合物中的磁性搅拌子(magnetic flea)进行混合。

[0236] 8. 制备 40mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)溶液(Intergen W22903 在去离子水中)。通过将等体积的 40mg/ml BSA 加入该胶乳/抗体/乙醇-乙酸盐混合物中封闭该胶乳并且在连续搅拌下在 41.5℃的水浴中孵育 30 分钟。

[0237] 9. 如步骤 2 中在 17000rpm 下将该混合物离心 10 分钟(在 Eppendorf 管之间将体积分成 1ml 的多份)。取出并且弃去上清液并且将该沉淀物再悬浮于 100mM DTB 中。重复如步骤 2 中的离心,移出并且弃去上清液并且将沉淀物再悬浮于 Air Brushing 缓冲液(20% (w/v) 蔗糖 Sigma S8501、10% BSA(w/v) 在 100mM 氨基丁三醇碱 Sigma T 1503 中至 pH9) 中。加入 Air Brushing 缓冲液以给出 4%的固体(w/v)胶乳。

[0238] 将在 BSA 和蔗糖的混合物中的结合胶乳以 50g/hr 和 110mm/s 的速率喷到一个玻璃纤维多孔载体(F529-09, Whatman)上并且使用设定为 65℃和速度 5(单程)的一台 Hedinar Conveyor Oven 序列号 17494 进行干燥。

[0239] 还将用于控制区的标记结合试剂如下置于与用于该分析物的标记结合试剂相同的多孔载体的区域上:

[0240] 将兔 IgG(Dako)结合至在 BSA/蔗糖中的 400nm 蓝色胶乳聚苯乙烯胶乳(Duke Scientific)以给出 0.7%固体的最终%蓝色胶乳并且以 65g/hr 喷到玻璃纤维上。

[0241] 使用透明的粘合剂涂覆的叠层薄膜(Ferrisgate, 38mm 宽)将具有被喷涂的标记结合试剂的玻璃纤维材料附接到该硝酸纤维素薄膜上,它被安排为使得该标记试剂在最上面并且该玻璃纤维沿着硝酸纤维素薄膜条带的长度(350mm)与该硝酸纤维素的表面重叠约 2mm。使该玻璃纤维附接到该硝酸纤维素的末端从而使它位于该检测区的上游。

[0242] 被选择作为参照区的区位于沿着该硝酸纤维素 13mm 的距离处,即该检测区的下游。

[0243] 随后将该层压板切成 6mm 宽的测试条。

[0244] 制备用于确定 hCG 的低灵敏度测定,该低灵敏度测定包括一个用于 hCG 的可移动的标记结合试剂以及提供在一个检测区的上游的一个玻璃纤维多孔载体上的用于 hCG 的一个可移动的第二结合试剂以及提供在一个硝酸纤维素多孔载体上的一个控制区。该检测区包含用于 hCG 的固定的结合试剂。

[0245] 检测区根据高灵敏度测定的检测区进行制备。

[0246] 使用一台 Biodot XYZ3050 分配平台将在 PBSA 缓冲剂中的 2mg/ml 山羊抗兔抗体(Lampire)以 1 μ l/cm 标绘在位于在该检测区的下游 3mm 处、在 13mm 位置处的硝酸纤维素上来制备控制区。

[0247] 制备可移动的标记试剂和第二结合试剂。

[0248] 将结合至 400nm 蓝色聚苯乙烯胶乳(Duke Scientific)上的小鼠抗人 α -hCG mAb(克隆 3299)与清除剂(scavenger)抗体 mAb 小鼠抗人 β -hCG(内部克隆 3468)以 3mg/ml 进行混合以给出 3%的最终%的蓝色胶乳、0.075mg/ml 最终浓度的 3468 以及 0.06mg/ml 浓度的游离抗 β hCG 抗体。使用 BIODOT XYZS(序列号 1673)将生成的混合物以 90g/hr 以

2.02 μ g/cm 喷到 F529-09 玻璃纤维上而喷绘到 Whatman 玻璃纤维 (F529 25mm 宽卷) 上。

[0249] 还将用于控制区的标记结合试剂如下置于与用于该分析物的标记结合试剂相同的多孔载体的区域上：

[0250] 将兔 IgG(Dako) 结合至在 BSA/ 蔗糖中的 400nm 蓝色胶乳聚苯乙烯胶乳 (Duke Scientific) 以给出 0.7% 固体的最终 % 的蓝色胶乳并且以 65g/hr 喷到玻璃纤维上。

[0251] 使用设定为 65°C 和速度 5 (单程) 的一台 Hedinar Conveyor Oven 序列号 17494 将该玻璃纤维进行干燥。然而在从最初的喷雾位置偏移 -0.8mm 处 (该玻璃纤维的更远的下游) 通过重复上述步骤将一个第二遍的胶乳置于该玻璃纤维上。随后使用设定为 65°C 和速度 5 (单程) 的一台 Hedinar Conveyor Oven 序列号 17494 将该玻璃纤维进行干燥。

[0252] 使用一种透明的粘合剂涂覆的叠层薄膜 (Ferrisgate, 38mm 宽) 将具有被喷涂的标记结合试剂的玻璃纤维材料连接到该硝酸纤维素膜, 它被安排为使得该标记试剂在最上面并且该玻璃纤维沿着硝酸纤维素膜的条带的长度 (350mm) 与该硝酸纤维素的表面重叠约 2mm。将该玻璃纤维连接到该硝酸纤维素的末端从而使它位于该检测区的上游。

[0253] 随后将该层压板切成 6mm 宽的测试条。

[0254] 将 45mm 长、12mm 宽并且厚度约 2.5mm 的一个共同的多孔样品接收器 (505521, Filtrona Fibertech) 提供在该第一和第二测定的上游并且与之重叠约 3mm。

[0255] 将该高灵敏度测定和低灵敏度测定封装在一个测定壳体内, 其中该多孔样品接收器部分地从该壳体伸出。

[0256] 对来自对应的检测区和控制区的信号进行测量并且相对于从该共享参照区测量的信号进行测量。

[0257] 作为对提供共享控制区和参照区的一个替代方案, 该高灵敏度测定和低灵敏度测定各自可以包含一个参照区和 / 或控制区。

[0258] 实例 2:

[0259] 为了确定受孕后日期而有待存入一个测定装置或阅读器中的阈值的确定

[0260] 将年龄在 18 至 45 岁的多名女性招募到一项研究中并且基于以下条件进行选择, 即在近 6 个月内她们具有 21 至 42 天之间的规律的月经周期、未进行母乳喂养、没有已知的不孕史、未患有多囊卵巢综合征、未患有慢性肾病或肝病、并且或者在过去 3 个月内自从停经后具有至少三个周期没有使用激素避孕药。这些女性在最少六个周期期间每天提供尿样并且使用一个 Unipath FAM™ 监控器每天对她们的尿的 LH 水平进行测量以便监测并且记录她们的 LH 峰的日期以及用于记录她们末次月经的第一天的日记。在该研究期间怀孕的 61 名女性中, 使用一台 Perkin Elmer AutoDelphia 实验室分析仪在她们的 LH 峰的日期后长达 90 天期间测量了在日常基础上的她们尿的 hCG 水平。对于知晓 LH 峰的日期的那些怀孕的个体, 对每一单独的女性, 使测量的 hCG 水平作为受孕后日期的一个函数生成一个数据集, 其中受孕日期被定义为 LH 峰 +1 天的日期。

[0261] 使用一个指数曲线来建立 $\log(hCG+0.1)$ 对妊娠的时间的模型, 其中:

[0262] $\log(hCG+0.1) = A+B \cdot R^x$

[0263] A (最大值)

[0264] B (截距和最大值之间的差)

[0265] R (增长速率)

[0266] X = 妊娠的时间

[0267] 原始数据和拟合的指数曲线显示在图 7 中。

[0268] 选择来自未妊娠女性的 31 个尿样并且在范围从 10-250,000mIU/ml hCG 的 20 个浓度下用 hCG 加标。将每个加标样品施用于根据实例 1 选自三个批次的六个测定装置。将对于高和低灵敏度测定的分析物信号值 (% A) 作为在 FDT 为 150s 下 hCG 浓度的一个函数进行测量。

[0269] 使用一个四参数逻辑曲线建立高灵敏度测定和低灵敏度测定两者的 % A 对 $\log(hCG+0.1)$ 浓度的模型。

[0270] 其中：

$$[0271] \quad \%A = A + \frac{C}{(1 + e^{-B(\log(hCG+0.1)-M)})}$$

[0272] 并且其中

[0273] B = 斜率

[0274] M = 导致在最小值和最大值之间半程响应的 $\log(hCG+0.1)$ 水平

[0275] C = 最大值和最小值之间的差

[0276] A = 最小值

[0277] 对于这些高灵敏度和低灵敏度测定,拟合成的并且观察到的关系显示于图 8(a) 和 (b) 中。

[0278] 设计了一个模拟研究以优化该 PDTmin、PDTmid 和 EPDTmax 阈值以便将妊娠最大化地分类成三个组:受孕后 ≤ 2 周、受孕后 2 周到 3 周以及受孕后 > 3 周,并且使用这些阈值来对该分类的准确度进行量化。

[0279] 对照来自五名怀孕受试者的真实样品的结果对这些阈值进行了评估,以便确定它们的准确度。

[0280] 以如下三个步骤进行该模拟：

[0281] 步骤 1

[0282] 在一个宽的阈值范围下进行该模拟。初始阈值是使用该装置的先验知识以及如从来自该第一数据集的指数模型所预测的组之间的边界来选择的。

[0283] PDTmin(%) -5、7.5、10

[0284] PDTmid(%) -30、32.5、35

[0285] EPDTmax(%) -43、45、47

[0286] 对于每个阈值选择 3 个值提供了有待模拟的 27 个阈值组合。

[0287] 步骤 2

[0288] 挑选步骤 1 中的最好的阈值组合并且关注该最好的组合周围的更窄的范围。

[0289] 步骤 3

[0290] 选择步骤 2 中的最好的阈值组合作为最佳集合并进行更精细的量化。

[0291] 将来自该第一数据集的指数模型和来自该第二数据集中的尿研究 (FDT = 150 秒) 的两个四参数逻辑模型用于该模拟过程中。

[0292] 对于以下间隔的每一个从一个均匀分布生成 10,000 个受孕后时间点 (post-concept time point)：

[0293] 7 到 10(7 到 9 天)

[0294] 10 到 15(10 到 14 天)

[0295] 15 到 22(2 到 3 周)

[0296] 22 到 43(3+ 周(长达 42 天))

[0297] 其中时间是连续的并且边界是在时间中的点。

[0298] 对于每个生成的时间点,对 $\log(\text{hCG}+0.1)$ 进行模拟。对于每个模拟的 $\log(\text{hCG}+0.1)$ 值,计算对于最低和最高 % A 值的值并且对于每对 % A 值使用一组阈值计算预测的受孕指导结果。

[0299] 在步骤 3 中,用 10,000 个受孕后时间点进行了更精细的模拟,这些时间点是针对从第 7 天到第 42 天的每一天的一个均匀分布生成的。每个采样间隔是从午夜到午夜,例如第 7 天生成的数据是 7 和 8 之间的实数。

[0300] 基于这项研究,对于 PDTmin、PDTmax 和 EPDTmax 以 % A 计算了阈值。可以将这些阈值存储在该测定装置或阅读器中以便计算受孕后时间。

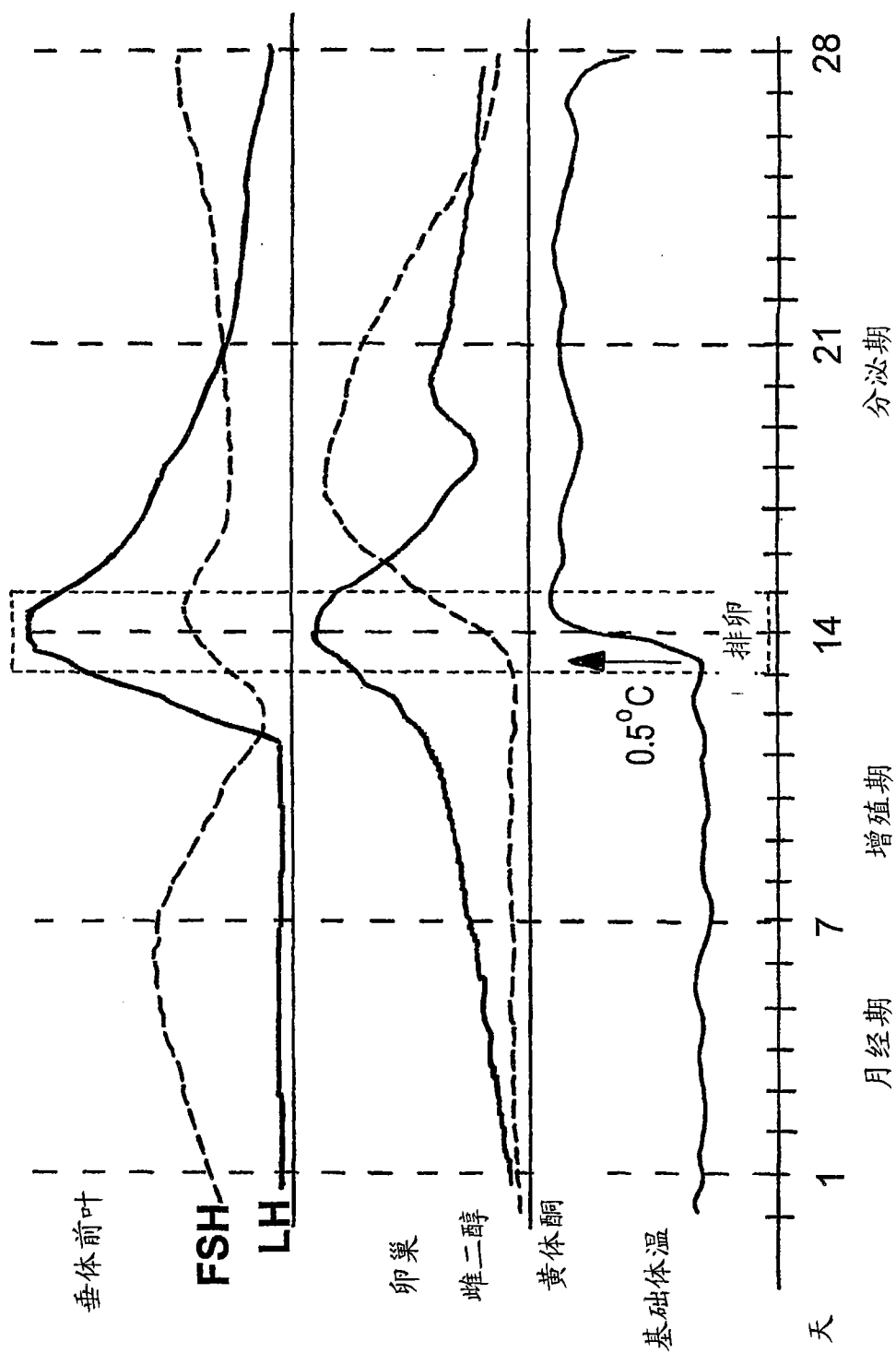


图 1

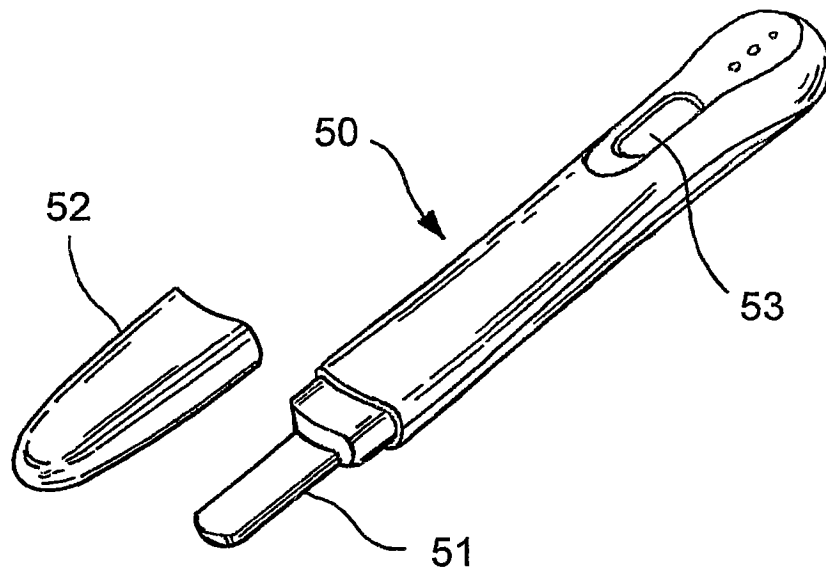


图 2a

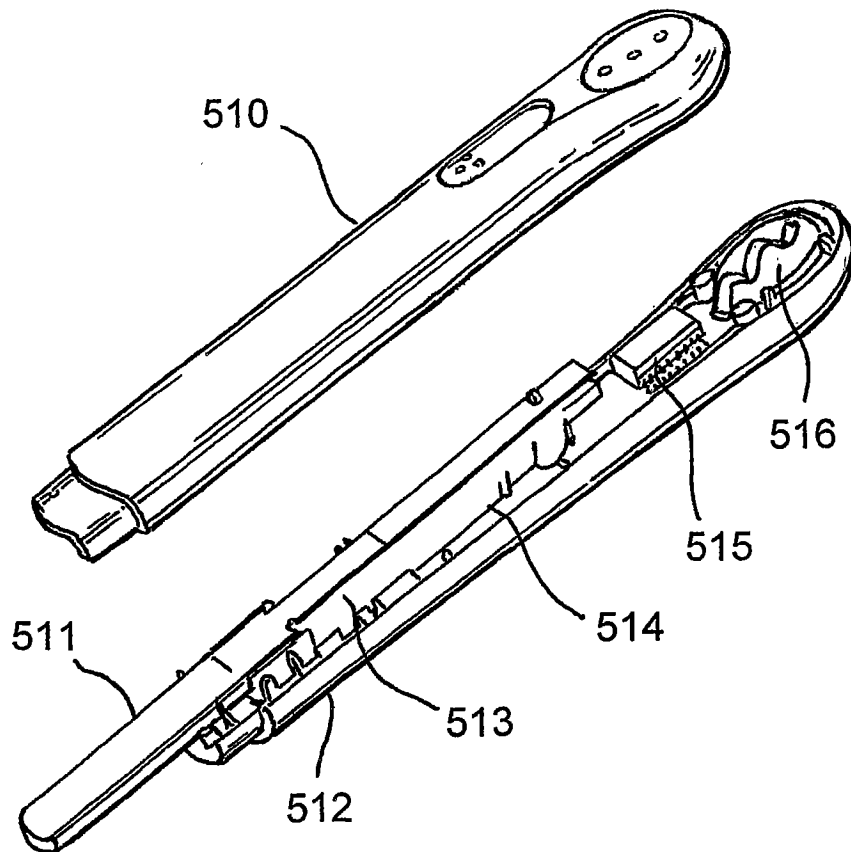


图 2b

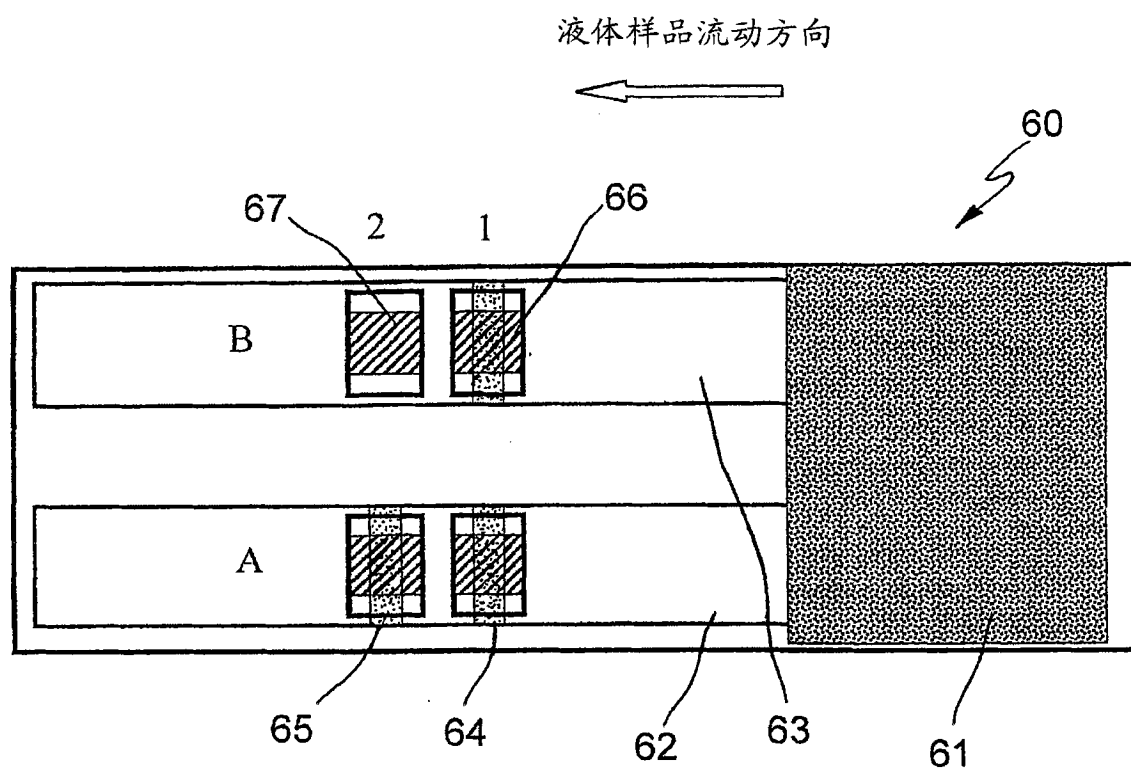
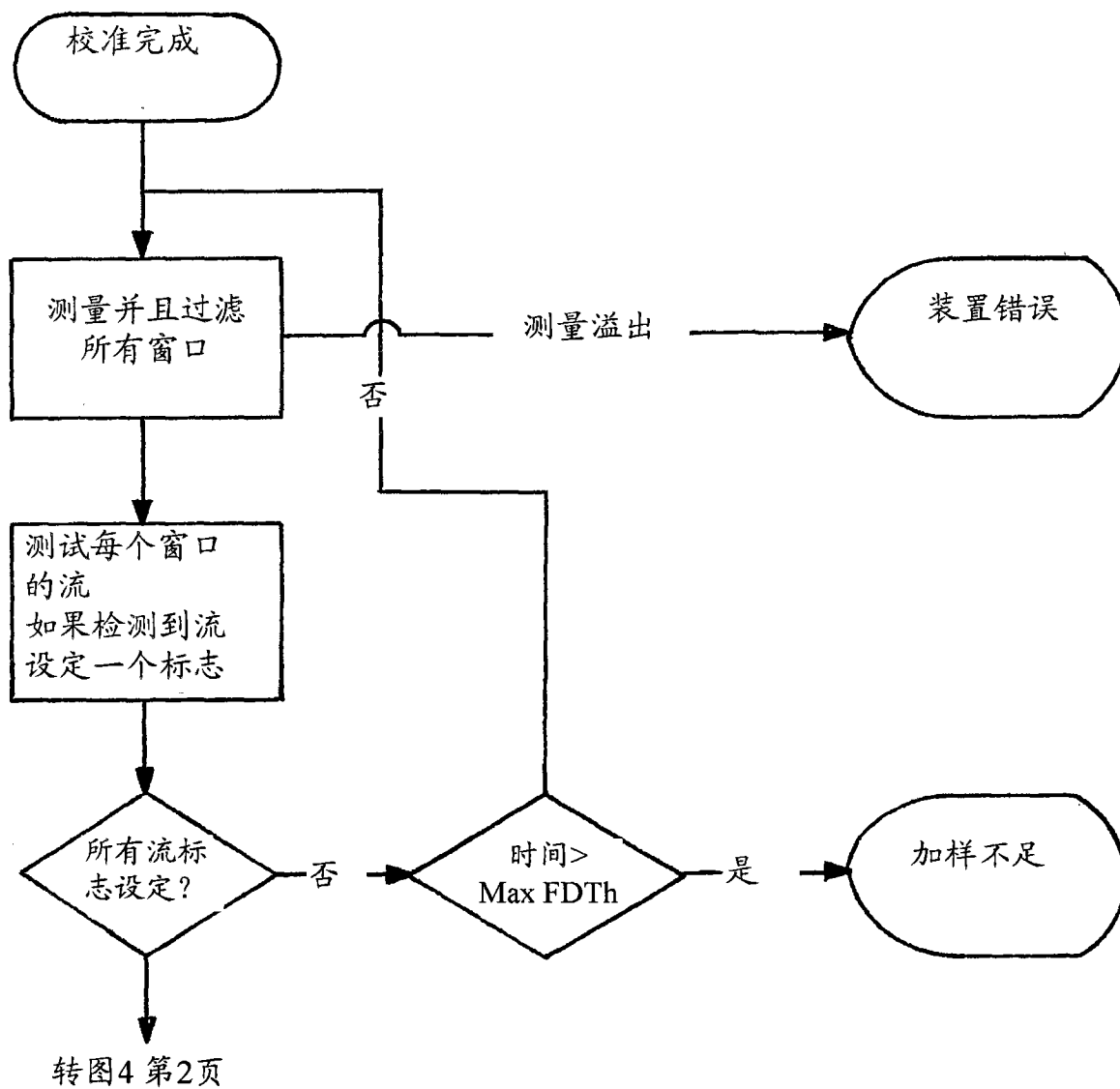


图 3



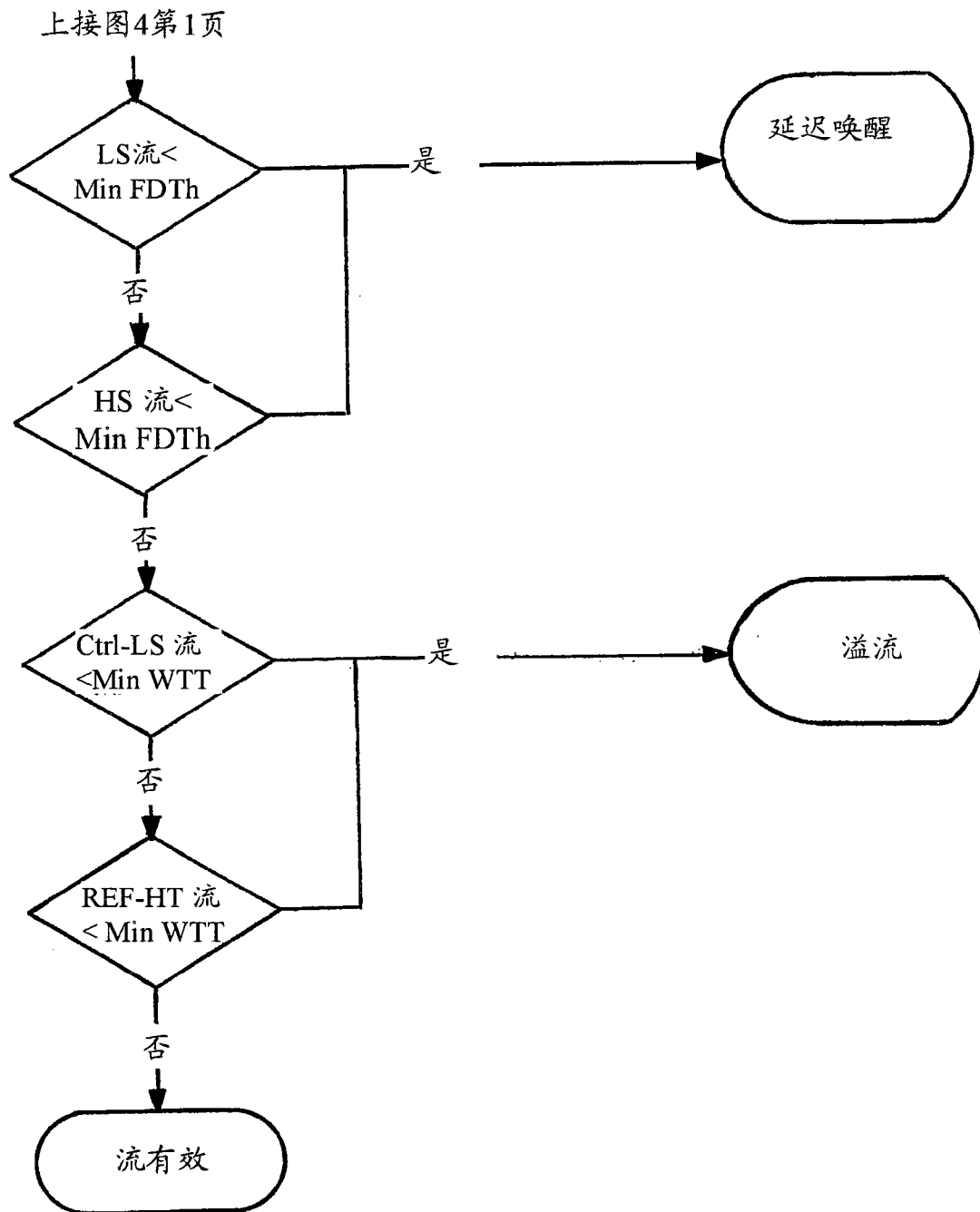
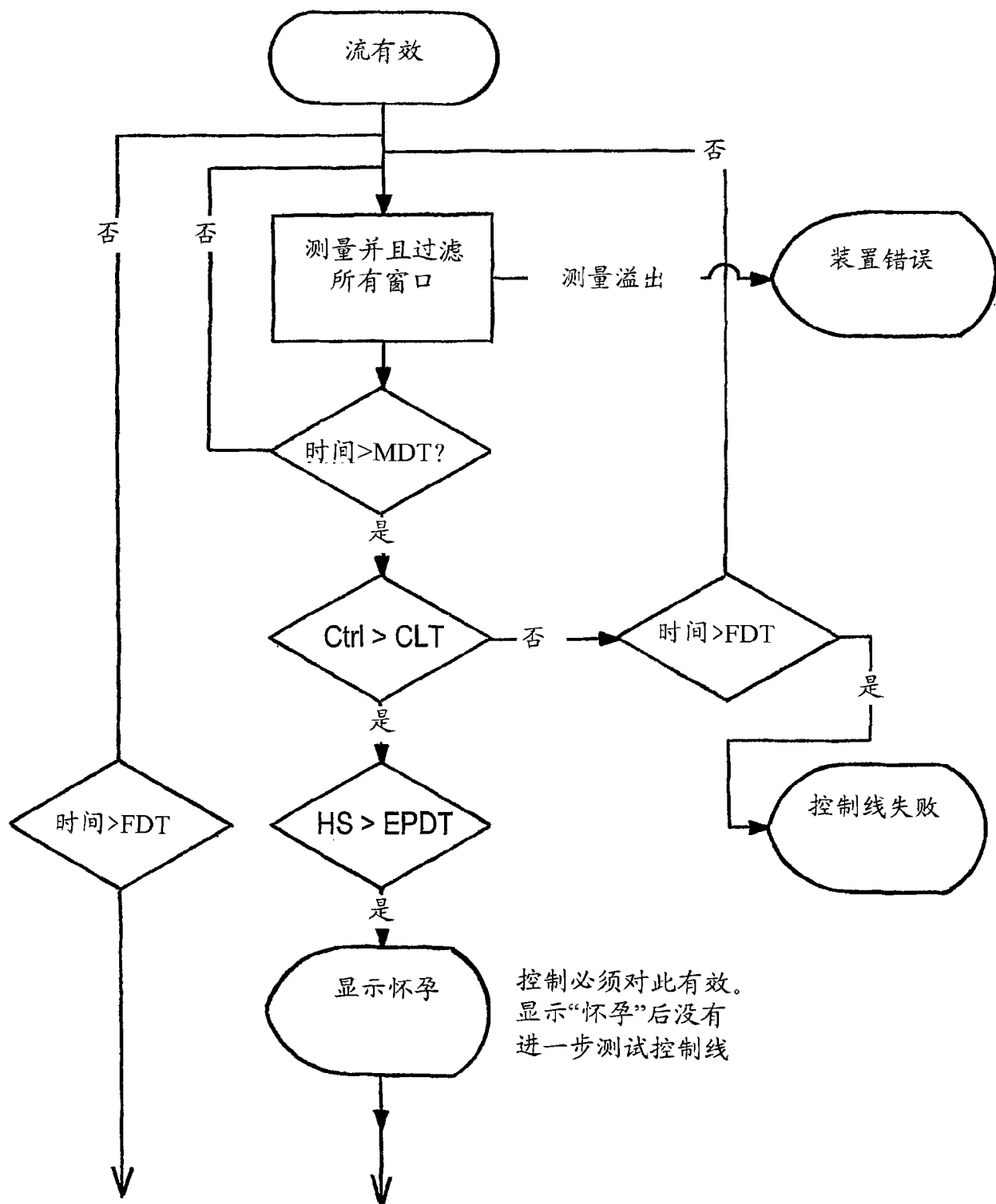


图 4



转图5 第2页

上接图5第1页

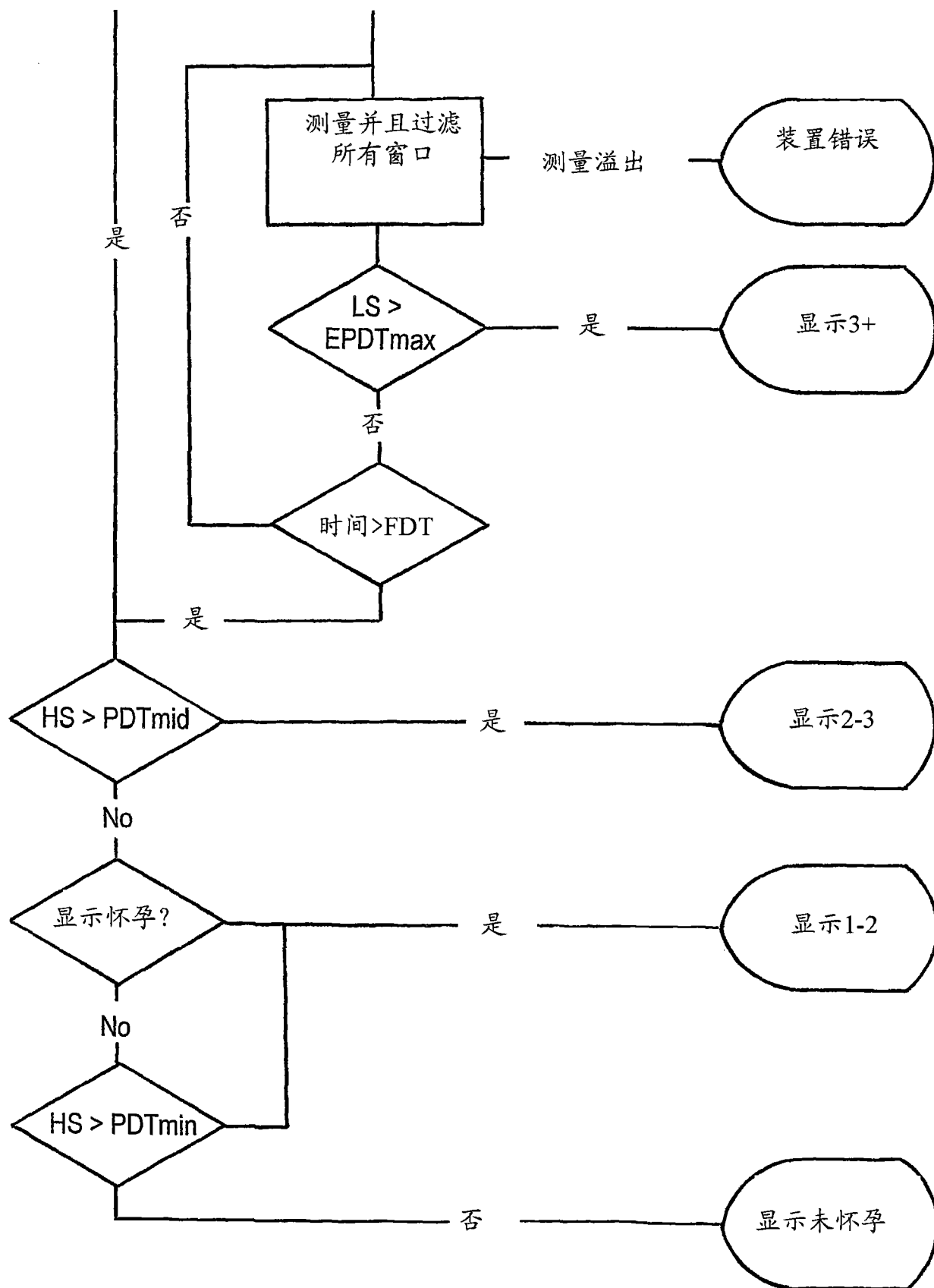


图 5

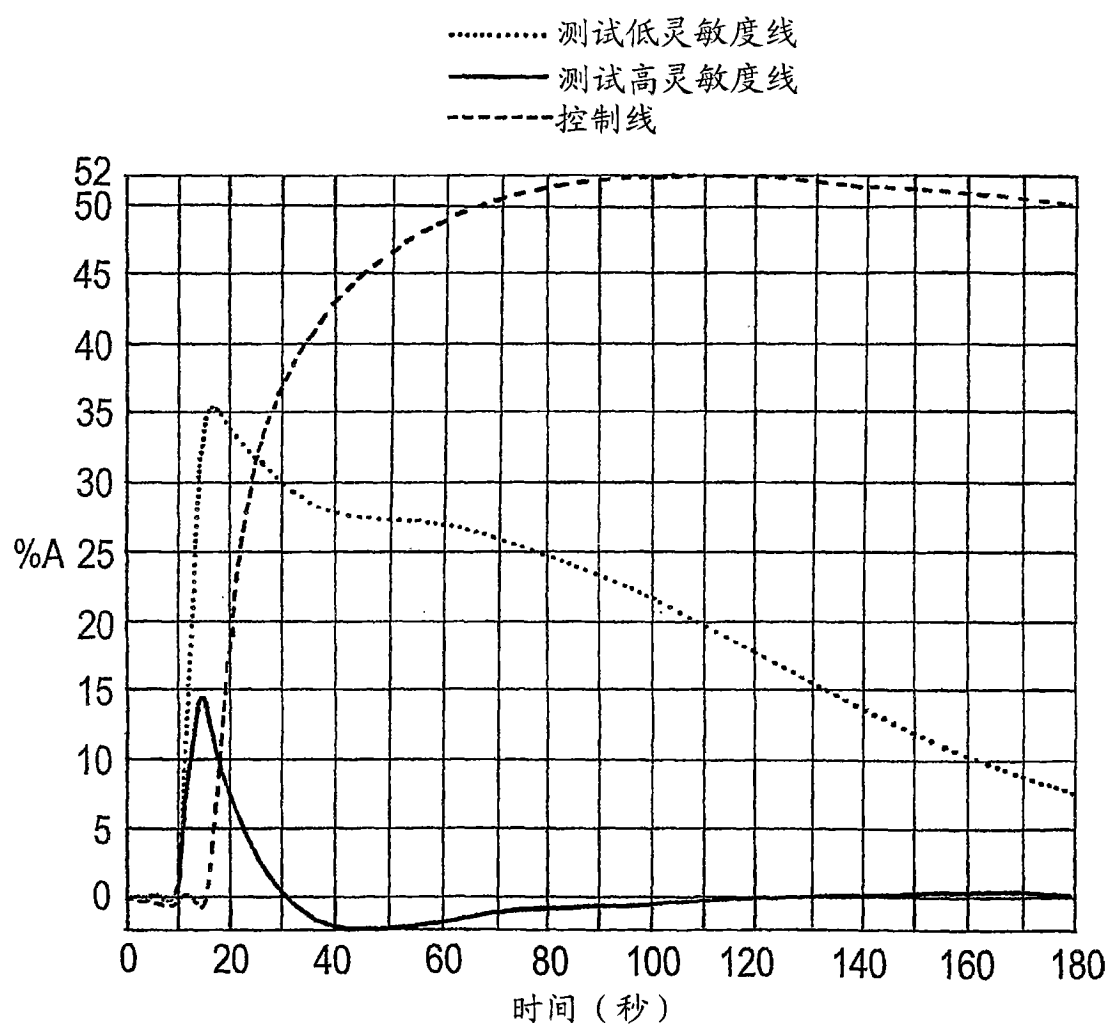


图 6(a)

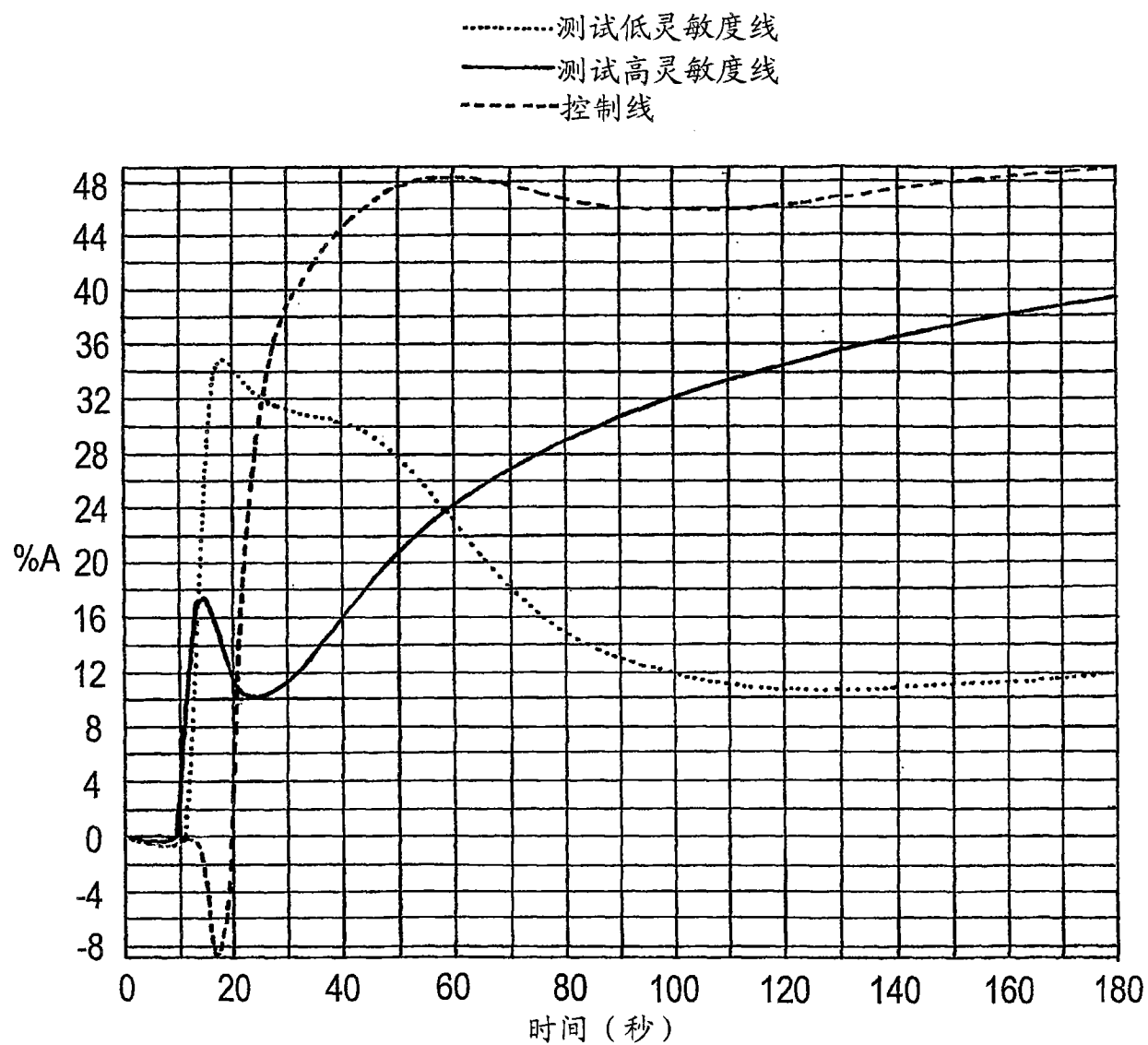


图 6(b)

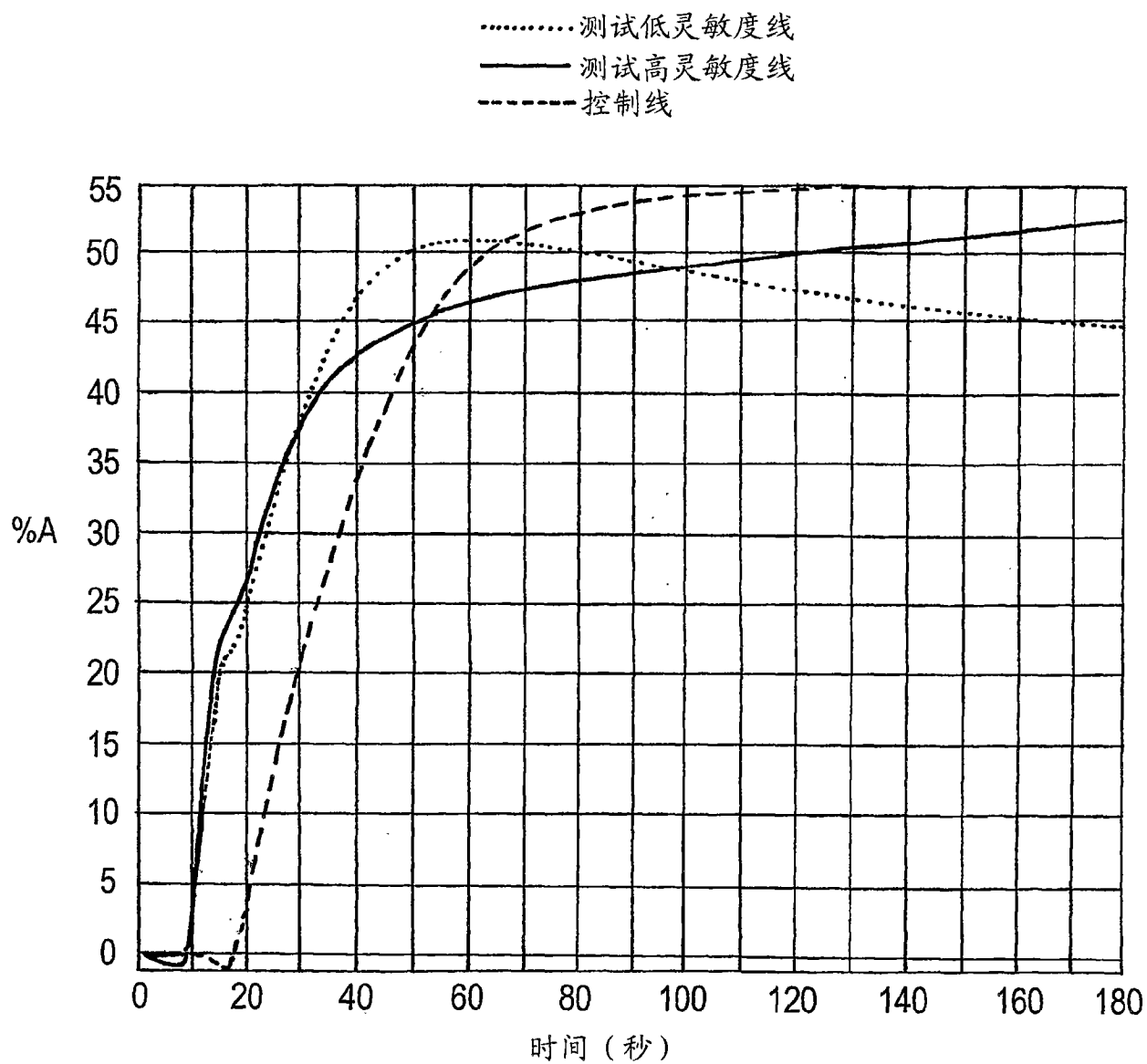


图 6(c)

妊娠天数对 $\log(hCG+0.1)$ 的原始数据以及拟合的指数曲线

拟合的和观察到的关系

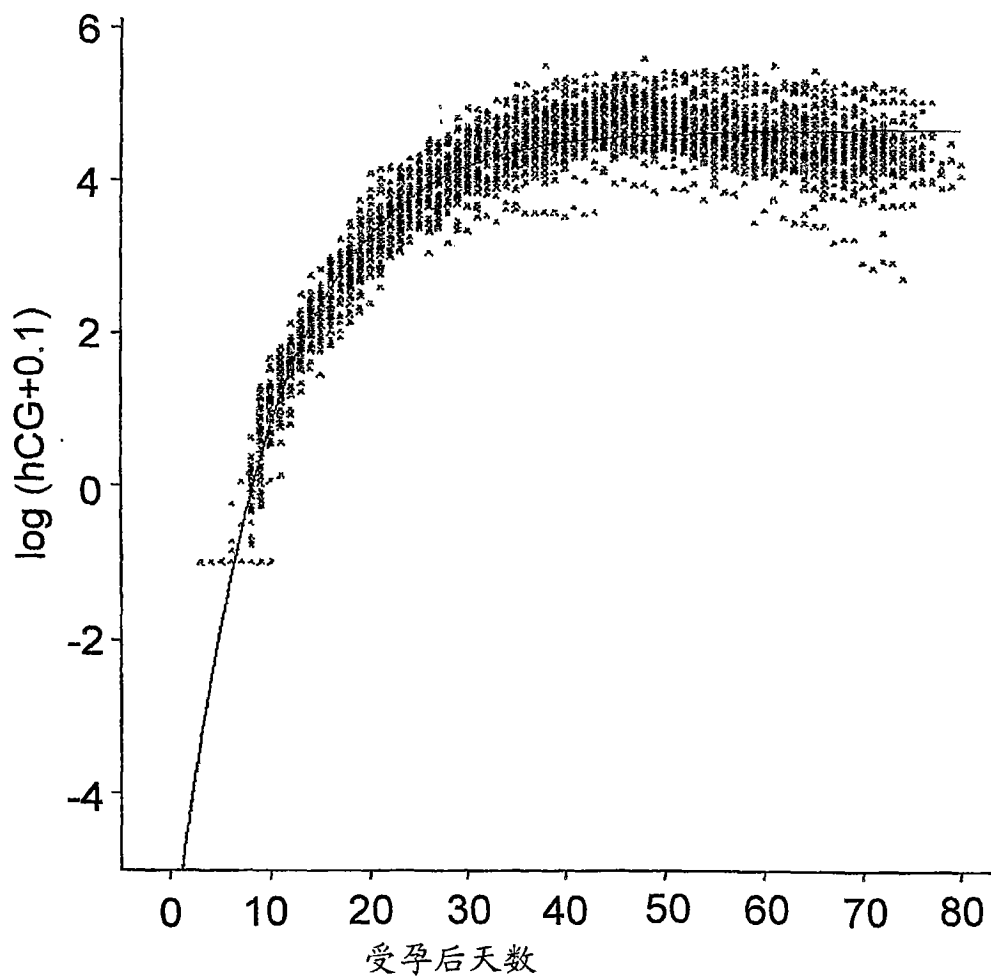


图 7

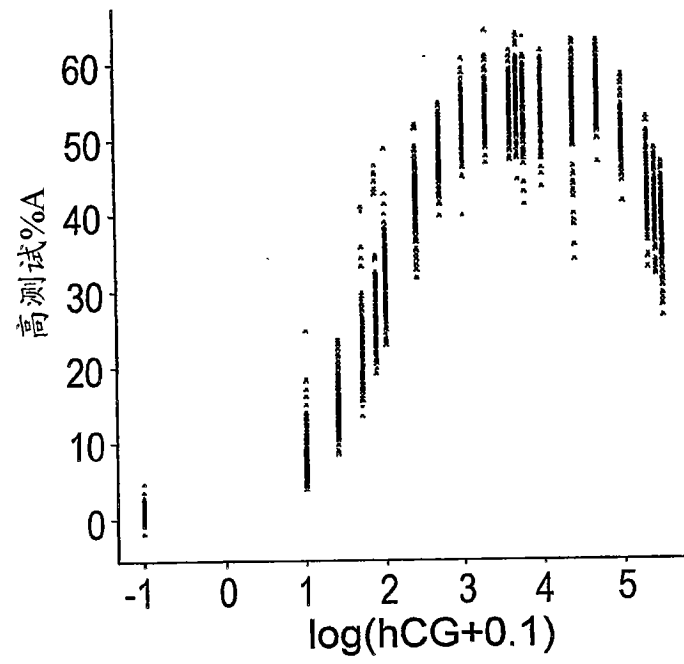


图 8a

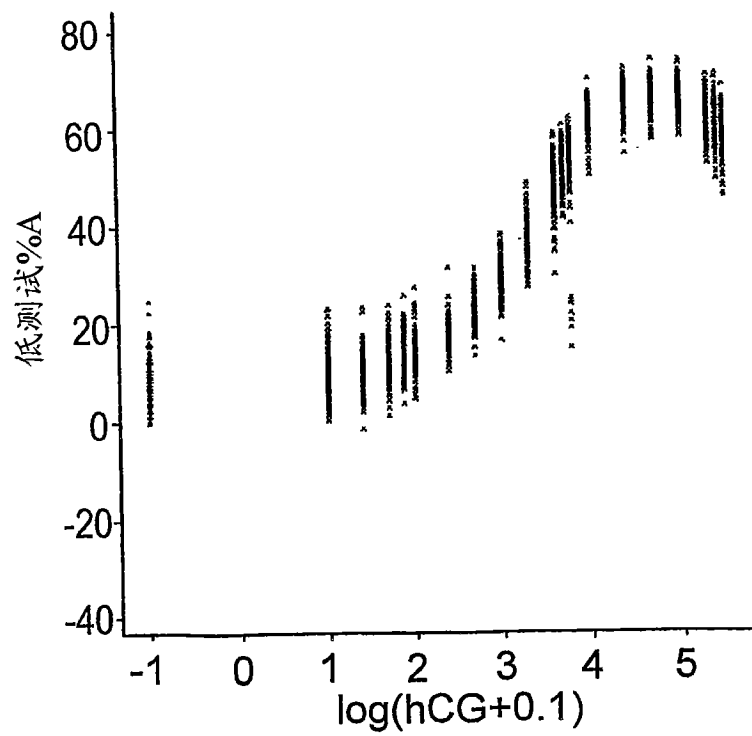


图 8b