

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 102**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2007 E 07738282 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1992950**

54 Título: **Lecho de absorción para inmunoensayo, tira para inmunoensayo y aparato de inmunoensayo**

30 Prioridad:

13.03.2006 JP 2006068239

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

08.01.2014

73 Titular/es:

**FUJIREBIO INC. (100.0%)
2-1-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku
Tokyo 163-0410, JP**

72 Inventor/es:

**OKAMURA, CHISATO y
SATO, MINORU**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 437 102 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

Lecho de absorción para inmunoensayo, tira para inmunoensayo y aparato de inmunoensayo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una tira para un inmunoensayo y a un aparato de inmunoensayo, y se refiere en particular a una tira para el inmunoensayo y a un aparato de inmunoensayo, que usan un lecho de absorción para el inmunoensayo que tiene una capacidad de absorción de agua notablemente excelente y acorta el tiempo de
10 detección, así como a usos de los mismos.

Antecedentes de la técnica

Los análisis de componentes biológicos o fármacos incluidos en muestras tales como sangre y orina son importantes para el diagnóstico de un estado patológico y la determinación de un proceso terapéutico. Por tanto, se ha usado un aparato de inmunoensayo que mide usando una reacción de antígeno-anticuerpo como aparato para detectar de
15 manera sencilla el componente biológico y el fármaco.

De manera convencional, se han analizado inmunológicamente muestras biológicas recogidas de la sangre, la orina y la secreción mucosa en el diagnóstico del estado patológico y la determinación del proceso terapéutico. Se ha desarrollado un aparato de inmunoensayo enzimático que usa la reacción antígeno-anticuerpo como aparato usado para análisis inmunológicos (véanse los documentos de patente 1 a 4).
20

En el aparato de inmunoensayo enzimático, por ejemplo, se forma un complejo de tipo sándwich mediante reacciones de antígeno-anticuerpo entre tres, es decir, un antígeno o anticuerpo en una muestra, una forma marcada enzimáticamente de un anticuerpo o antígeno que reacciona con dicho antígeno o anticuerpo y un anticuerpo o antígeno que reacciona con dicho antígeno o anticuerpo, y se detecta la presencia o ausencia del complejo usando un sustrato que desarrolla un color reaccionando con la enzima. En estos aparatos, un extremo correspondiente a una parte aguas abajo del aparato está dotado de un lecho de absorción porque cada
25 componente se disuelve secuencialmente en un tampón de desarrollo y la disolución se mueve en una dirección constante en el aparato (véase el documento de patente 3).
30

El lecho de absorción está constituido por un material absorbente y, por ejemplo, se ha descrito que pueden aplicarse materiales no tejidos hechos de papeles de filtro absorbentes o fibras de vidrio, materiales porosos y elementos fibrosos (documento de patente 4).
35

Documento de patente 1: patente n.º 3248436.

Documento de patente 2: patente n.º 3284896.
40

Documento de patente 3: documento JP 2005-503556-A.

Documento de patente 4: documento JP 2005-83927-A.

El documento publicado como documento WO9947930 da a conocer un dispositivo de ensayo para detectar la presencia de un analito en una muestra de fluido. Este dispositivo contiene cuatro zonas distintas: zona de recepción, zona de marcaje, zona de captura y zona absorbente. La zona absorbente contiene un desecante tal como gel de sílice activado. Este documento menciona el uso de papel desecante Drikette "SG-145" que contiene al menos un 50% de gel de sílice activado así como el uso de papel Whatman "SG81" que está hecho de una matriz de fibras celulares semirrígidas que contiene gel de sílice.
45
50

Descripción de la invención

PROBLEMA QUE VA A SOLUCIONARSE MEDIANTE LA INVENCION

Sin embargo, la capacidad de absorción de agua es insuficiente en cualquier lecho de absorción que usa los materiales absorbentes convencionales, y lleva algo de tiempo detectar un resultado en el aparato usando un material de este tipo. En particular, cuando el antígeno o anticuerpo derivado de una enfermedad infecciosa se somete a la medición, es mejor que el tiempo de detección sea tan corto como sea posible en cuanto a tratamiento rápido y prevención de la propagación de la enfermedad infecciosa.
55
60

Mientras tanto, el aparato de inmunoensayo convencional se fabrica laminando individualmente cada elemento en un casete y, por tanto, la capacidad de absorción de agua puede potenciarse utilizando uno que tenga una anchura relativamente ancha como lecho de absorción. Sin embargo, en los últimos años se convertido en dominante un sistema laminado en el que todos los elementos incluyendo el lecho de absorción se adhieren con sellos para integrarse y luego se alojan en el casete. En este caso, se usa a menudo uno que tiene una anchura estrecha como
65

lecho de absorción para potenciar la eficacia de producción. Por tanto, se ha requerido un lecho de absorción en línea con el reciente sistema de producción, que tenga una capacidad de absorción de agua notablemente excelente.

5 En el presente documento, un principio habitualmente posible como procedimiento para acortar el tiempo de detección en el aparato de inmunoensayo puede incluir la potenciación de la capilaridad expandiendo poros en una parte de la membrana en la que el tampón de desarrollo se absorbe y se mueve. Sin embargo, cuando los poros se expanden, no se expresa nítidamente una línea de determinación que muestre un resultado de determinación.

10 En vista de los problemas anteriores, es un objeto de la presente invención proporcionar un lecho de absorción que muestre una capacidad de absorción de agua notable y pueda acortar el tiempo de detección cuando se emplee en un aparato de inmunoensayo.

15 MEDIOS PARA SOLUCIONAR EL PROBLEMA

15 Como resultado de un extenso estudio, los presentes inventores han encontrado que la capacidad de absorción de agua se potencia notablemente al contener partículas que contienen silicio que muestran una capacidad de absorción de humedad particular en una determinada cantidad o más en un material absorbente también usado para el lecho de absorción convencional.

20 Además, los presentes inventores han encontrado que el tiempo de detección puede acortarse en un aparato de inmunoensayo usando este lecho de absorción, y que incluso cuando se usa el lecho de absorción que tiene la anchura estrecha, el tiempo de detección puede acortarse adicionalmente en comparación con el aparato de inmunoensayo que carga el lecho de absorción convencional que tiene la anchura ancha. La presente invención se basa en tales hallazgos.

25 La presente invención proporciona los siguientes puntos [1] a [3]:

30 [1] Una tira para un inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

[2] Un aparato de inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 6-7.

[3] Un método de inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 8-9.

35 EFECTO DE LA INVENCION

40 Según la presente invención, el lecho de absorción para el inmunoensayo, que muestra una capacidad de absorción de agua notable, se usa según las reivindicaciones, y se proporcionan la tira para el inmunoensayo y el aparato de inmunoensayo que pueden detectar de manera precisa en un corto tiempo. Por tanto, la presente invención contribuye al diagnóstico rápido del estado patológico y la determinación rápida del proceso terapéutico en enfermedades infecciosas.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 es una vista esquemática de un ejemplo de un lecho de absorción para el inmunoensayo de la presente invención cuando se observa desde encima de la superficie;

50 la figura 2 es una vista esquemática de un ejemplo de un lecho de absorción para el inmunoensayo de la presente invención cuando se observa desde un lado;

la figura 3 es una vista esquemática de un ejemplo de un lecho de absorción para el inmunoensayo de la presente invención cuando se observa desde encima de la superficie;

55 la figura 4 es una vista esquemática de un ejemplo de un lecho de absorción para el inmunoensayo de la presente invención cuando se observa desde el lado;

la figura 5 es una vista esquemática del aparato en la figura 4 cuando se observa desde la parte superior;

60 la figura 6 es una vista esquemática de un aparato de inmunoensayo que comprende un casete cuando se observa desde el lado;

la figura 7 es una vista que muestra los cambios con el tiempo de las cantidades de absorción de agua en lechos de absorción en aparatos de inmunoensayo en los ejemplos 1 y 2 y los ejemplos comparativos 1 y 2;

65 la figura 8 es una vista que muestra los tiempos de detección en aparatos de inmunoensayo en los ejemplos 3 y 4 y los ejemplos comparativos 3 y 4;

la figura 9 es una vista que muestra la comparación del tiempo de detección en el aparato de inmunoensayo usando el ejemplo 5 con el tiempo de detección en el aparato de inmunoensayo usando el ejemplo comparativo 6;

5 la figura 10 es una vista que muestra la comparación del tiempo de detección en el aparato de inmunoensayo usando el ejemplo comparativo 5 con el tiempo de detección en el aparato de inmunoensayo usando el ejemplo comparativo 6; y

10 la figura 11 es una vista que muestra los tiempos de detección en los aparatos de inmunoensayo en los ejemplos 6 a 9.

Explicaciones de las letras o los números de referencia

- 15 1 Tira para inmunoensayo
- 2 Aparato de inmunoensayo
- 3 Parte de succión
- 20 4 Parte que contiene forma marcada
- 5 Parte que contiene sustrato
- 25 6 Sitio de detección
- 7 Cartulina (material de base)
- 8 Cinta adhesiva (sello)
- 30 9 Casete (bastidor)
- 10 Ventana de goteo de muestra
- 35 11 Ventana de detección
- 12 Parte convexa

Mejores modos para llevar a cabo la invención

40 La presente invención utiliza un lecho de absorción para un inmunoensayo, y se refiere a una tira para un inmunoensayo que utiliza el lecho, y a un aparato de inmunoensayo, que se describirán secuencialmente a continuación.

45 (1) Lecho de absorción para el inmunoensayo de la presente invención

El lecho de absorción para el inmunoensayo de la presente invención se caracteriza por contener un 50% en peso o más de partículas que contienen silicio que tienen una capacidad de absorción de humedad del 30% o menos a una humedad del 60% o menos y una capacidad de absorción de humedad del 40% o más a una humedad del 90% o más.

50 La partícula que contiene silicio tal como se usa en el presente documento significa que la partícula contiene silicio (Si) o compuesto(s) de silicio. El compuesto de silicio significa una sustancia unida químicamente a silicio, y puede incluir óxido de silicio (cuarzo, SiO₂), nitruro de silicio (Si₃N₄) y carburo de silicio (SiC). La razón de contención de silicio o el compuesto de silicio no está particularmente limitada. Una forma del mismo es preferiblemente particulada. El diámetro de partícula promedio de las partículas finas depende del volumen de poro y es deseablemente más pequeño en general. Específicamente, es preferiblemente de 14 μm o menos y más preferiblemente de 4,5 μm o menos. El diámetro de poro promedio es preferiblemente de 25 a 240 angstroms y de manera particularmente preferible de 70 a 210 angstroms. El volumen de poro es preferiblemente de 0,44 a 1,80 ml/g y de manera particularmente preferible de 0,80 a 1,60 ml/g.

60 Gel de sílice es la partícula que contiene silicio usada en la presente invención. El gel de sílice es un gel de óxido de silicio (SiO₂) y un polvo poroso. El gel de sílice usado preferiblemente en la presente invención puede incluir los que presentan agregación bruta de partículas y que tienen diámetros de partícula grandes, áreas superficiales pequeñas y volúmenes de poro grandes. Más específicamente, es preferible gel de sílice en forma de B según la norma JIS Z 0701. Es decir, pueden usarse preferiblemente los que tienen una capacidad de absorción de humedad del 3,0% o más, el 10,0% o más o el 50,0% o más a una humedad relativa del 20%, el 50% o el 90%, respectivamente, un

porcentaje de contenido en agua del 2,5% o menos, un valor de pH de 4 a 8, una resistencia específica de 3.000 Ω ·cm o más y el 98% o más de anhídrido de ácido sílico en los componentes.

5 En la presente invención, es necesario usar las partículas que contienen silicio que muestran una capacidad de absorción de humedad del 30% o menos a una humedad del 60% o menos y una capacidad de absorción de humedad del 40% o más a una humedad del 90% o más. Preferiblemente, pueden incluirse las partículas que contienen silicio que muestran una capacidad de absorción de humedad del 20% o menos a una humedad del 60% o menos y una capacidad de absorción de humedad del 70% o más a una humedad del 95% o más. Cuando la capacidad de absorción de humedad se aparta del intervalo mencionado anteriormente, la humedad se absorbe antes de comenzar el inmunoensayo y es probable que impida que se acorte el tiempo de detección en el inmunoensayo real. Mientras tanto, el límite inferior de la capacidad de absorción de humedad puede fijarse apropiadamente dentro del intervalo en el que la función como lecho de absorción se ejerce suficientemente con la reacción de inmunoensayo. La capacidad de absorción de agua puede obtenerse multiplicando por 100 un valor numérico obtenido dividiendo un valor obtenido restando una masa seca (peso seco) de gel de sílice de una masa de absorción de humedad (peso de absorción de humedad) de gel de sílice entre la masa seca (peso seco) de gel de sílice.

20 Es necesario que el lecho de absorción utilizado por la presente invención contenga el 50% en peso o más de las partículas que contienen silicio tal como se describió anteriormente en peso seco. Cuando la tasa de contención es inferior al 50% en peso, la capacidad de absorción de agua se vuelve insuficiente y se observa menos mejora del tiempo de detección.

25 El material para el lecho de absorción no está particularmente limitado siempre que tenga la capacidad de absorción de agua, y puede estar compuesto por, por ejemplo materiales constituidos por compuestos poliméricos naturales o sintéticos tales como materiales porosos de poli(alcohol vinílico) (PVA), materiales no tejidos y celulosa, esponjas y papeles de filtro solos o en combinación. El tamaño y grosor del lecho de absorción no está limitado, pero normalmente es preferible para medir eficazmente usar un lecho que tiene unas longitudes longitudinal y transversal de aproximadamente 3 mm a 15 mm y un grosor de aproximadamente 0,5 mm a 4 mm. El método para la fabricación de un lecho de absorción de este tipo no está particularmente limitado, y el lecho puede fabricarse, por ejemplo, mezclando un material de partida (por ejemplo, papel de filtro) y las partículas que contienen silicio (gel de sílice) en un disolvente orgánico y luego evaporando el disolvente orgánico.

30 Un lecho de absorción de este tipo para el inmunoensayo de la presente invención es útil como lecho de absorción de la tira para el inmunoensayo. La tira para el inmunoensayo es un dispositivo para medir inmunológicamente el antígeno y/o el anticuerpo en la muestra utilizando la reacción de antígeno-anticuerpo. Los métodos de medición que utilizan la reacción de antígeno-anticuerpo pueden incluir inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunocromatografía e inmunotransferencia.

35 Los que se prefieren como tira para el inmunoensayo usando el lecho de absorción tal como se define en el presente documento son los descritos a continuación.

40 (2) Tira para el inmunoensayo de la presente invención

45 La tira para el inmunoensayo significa una tira para medir inmunológicamente una sustancia particular en la muestra. El material para la tira para el inmunoensayo puede seleccionarse apropiadamente de los materiales en los que la muestra, la forma marcada, el sustrato y el tampón de desarrollo pueden permear y moverse, y particularmente es preferible el material que puede ejecutar la disolución mediante una acción capilar. Por ejemplo, pueden usarse materiales absorbentes de agua como materiales de membrana. Específicamente, el material puede incluir papeles de filtro y membranas porosas formadas por celulosa tal como celulosa y nitrocelulosa o derivados de la misma, o fibras de vidrio. La tira también puede usarse bloqueando una parte de la misma con albúmina sérica bovina (BSA), caseína o sacarosa con el fin de impedir la adsorción debida a reacciones no específicas de proteínas.

50 La forma y el tamaño de la tira para el inmunoensayo no están limitados, y es posible preparar, por ejemplo, una tira que tiene una anchura de aproximadamente 3 a 10 mm y una longitud de aproximadamente 30 a 100 mm. Particularmente, también es posible preparar una forma más larga y más fina en la tira para el inmunoensayo de la presente invención porque el lecho de absorción descrito en el punto anterior (1) está anexado como parte de succión. El grosor de la tira es preferiblemente de 100 μ m a 1 mm. También es posible preparar un grosor relativamente fino porque no es necesario impregnar la disolución en una gran cantidad como parte de succión y parte que contiene sustrato descritas más adelante.

55 La tira para el inmunoensayo de la presente invención se prepara anexando la parte de succión constituida por el lecho de absorción descrito en el punto (1) mencionado anteriormente. La parte de succión es un elemento absorbente de agua para producir la permeación del antígeno, el anticuerpo y la muestra en la tira y el movimiento fácil de los mismos en la tira, y es necesario usar el lecho de absorción mencionado anteriormente como parte de succión en la presente invención. Esto permite potenciar la sensibilidad de detección de un componente traza en la muestra y analizar las disoluciones de la muestra en grandes cantidades.

El tamaño y la forma de la parte de succión no están particularmente limitados, pero es preferible hacer un tamaño que pueda colocarse en la tira. Por citar un ejemplo, es preferible hacer una anchura 1 a 10 mm y particularmente de 4 a 6 mm. Es preferible hacer una longitud de 10 a 50 mm y particularmente de 13 a 17 mm. Es preferible hacer un grosor de 0,5 a 2 mm y particularmente de 0,7 a 1,2 mm.

En la presente invención, el lecho de absorción mencionado anteriormente que tiene una capacidad de absorción excelente se usa como parte de succión. Por tanto, incluso cuando se usa la forma fina y larga más pequeña, puede ejercerse una capacidad de absorción excelente y puede acortarse el tiempo de detección.

La posición de la parte de succión sobre la tira no está particularmente limitada siempre que la muestra y la forma marcada se muevan en la dirección particular en la tira tras la detección mediante la acción de la parte de succión, pero es preferible que la parte de succión esté anexada a un extremo de la tira. El lecho de absorción como parte de succión puede anexarse a la tira con cinta adhesiva o un material laminado con un agente de fusión en caliente según sea necesario.

La tira para el inmunoensayo de la presente invención comprende la parte que contiene forma marcada que contiene la forma marcada del anticuerpo y/o antígeno correspondiente al antígeno y/o anticuerpo que va a detectarse. Al contener la forma marcada, la detección de la muestra se vuelve fácil porque la forma marcada se succiona junto con la muestra mediante la parte de succión dentro de la tira y forma el complejo junto con la muestra. Cuando se usa una forma marcada enzimáticamente como forma marcada, la detección de la muestra se vuelve todavía más fácil porque la forma marcada enzimáticamente se une al sustrato formando una forma marcada unida a sustrato y la muestra y la forma marcada unida a sustrato constituyen un complejo de tipo sándwich.

La forma marcada significa una obtenida uniendo alguna clase de marcador al anticuerpo y/o antígeno correspondiente al antígeno y/o anticuerpo que va a detectarse. Es decir, cuando el antígeno se somete a la detección, está contenida la forma marcada del anticuerpo correspondiente al mismo, y cuando el anticuerpo se somete a la detección, está contenida la forma marcada del antígeno correspondiente al mismo. También es posible contener dos o más anticuerpos y antígenos.

El método para fabricar el anticuerpo y/o antígeno marcado no está particularmente limitado siempre que presenten la reacción de antígeno-anticuerpo frente al antígeno y/o anticuerpo que va a detectarse. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo y/o antígeno obtenido mediante cultivo celular usando métodos convencionales, y también puede usarse un anticuerpo y/o antígeno recombinante obtenido mediante recombinación génica. Además, puede usarse un antígeno de fusión producido fusionando dos o más antígenos, fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab y fragmentos F(ab)₂, y haptenos.

Los ejemplos del marcador pueden incluir enzimas, radioisótopos, látex, partículas de coloides metálicos, partículas fluorescentes y partículas coloreadas.

La enzima puede incluir diversas enzimas usadas convencionalmente para los inmunoensayos enzimáticos (EIA). Los ejemplos de la misma pueden incluir fosfatasa alcalina, peroxidasa y β-D-galactosidasa. Los ejemplos del radioisótopo pueden incluir isótopos de yodo, tritio y carbono. Por ejemplo, es posible marcar usando el método que usa reactivos de Bolton Hunter.

Los ejemplos del látex pueden incluir partículas de compuestos poliméricos tales como látex de poliestireno. La partícula de coloide metálico es la partícula constituida por diversos coloides metálicos. Los ejemplos de la misma pueden incluir las partículas constituidas por coloides metálicos de selenio, platino y oro. El diámetro de partícula de la partícula es preferiblemente de 10 nm a 1 μm.

La partícula fluorescente significa que la partícula emite fluorescencia, y los ejemplos de la misma pueden incluir las partículas de poliestireno, copolímeros de estireno-butadieno, copolímeros de estireno-ácido acrílico y vidrio que contiene sustancias fluorescentes tales como fluoresceína, rodamina y cianuro de platino. La partícula coloreada es la partícula compuesta por un compuesto polimérico orgánico o un compuesto inorgánico coloreado con diversos colorantes y pigmentos, y por ejemplo compuesta por el material obtenido de poliestireno, poli(acrilato de metilo), poli(acrilamida), polipropileno, policarbonato y vidrio solo o en mezcla. El diámetro de partícula de la partícula fluorescente y la partícula coloreada es preferiblemente de 10 nm a 1 μm.

El anticuerpo y/o antígeno marcado pueden producirse formando un enlace covalente o un enlace no covalente entre el anticuerpo y/o antígeno y el marcador mediante un método convencional. Específicamente, es posible utilizar un método de glutaraldehído, un método de ácido peryódico, un método de maleimida, un método de disulfuro de piridilo y métodos que usan diversos agentes de reticulación (por ejemplo, véase *Proteins, Nucleic Acids and Enzymes*, supl. vol. 31: 37-45, 1985). Los ejemplos del agente de reticulación que puede usarse en métodos de unión usando el agente de reticulación pueden incluir N-succinimidil-4-maleimidobutirato (GMBS), N-succinimidil-6-maleimidohexanoato y N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato.

Cuando se forma un enlace covalente, puede usarse un grupo funcional presente en el antígeno o anticuerpo y, adicionalmente, el grupo funcional tal como un grupo tiol, un grupo amino, un grupo carboxilo o un grupo hidroxilo se introduce previamente, y entonces puede producirse el marcado mediante el método de unión anterior. El método para formar el enlace no covalente puede incluir un método de absorción física.

La posición de la parte que contiene forma marcada sobre la tira no está particularmente limitada, y puede ser cualquier posición distinta del extremo en el que está anexada la parte de succión. Por ejemplo, tal posición puede ser también el otro extremo en el que está anexada la parte de succión, o puede ubicarse en una parte central (entre la parte de succión y la parte que contiene sustrato) cuando se proporciona la parte que contiene sustrato descrita más adelante.

La parte que contiene forma marcada puede formarse conteniendo la forma marcada seca en el cuerpo principal de la tira o en un material absorbente distinto como lecho que contiene forma marcada. La cantidad de la forma marcada contenida en la parte que contiene forma marcada puede cambiarse apropiadamente dependiendo de si la parte que contiene forma marcada es una parte de la tira o un elemento distinto o dependiendo del tipo de anticuerpo y/o antígeno sometido al examen y la cantidad de muestra usada para la medición, y es normalmente de aproximadamente 0,01 a 5 µg en peso seco.

Cuando la forma marcada está contenida en el cuerpo principal de la tira, la tira puede aligerarse ya que así puede fabricarse fácilmente. En este caso, es preferible contener una marcada con el látex o el coloide metálico como forma marcada.

Mientras tanto, anexando el material absorbente distinto de la tira como lecho que contiene forma marcada sobre la tira, es posible contener la forma marcada suficientemente, mover suavemente el tampón de desarrollo en la tira y realizar el inmunoensayo preciso con alta sensibilidad en un tiempo corto incluso cuando se usa una muestra en gran cantidad. El material absorbente es preferiblemente uno que contiene la forma marcada en gran cantidad, y los ejemplos del mismo pueden incluir materiales constituidos por compuestos poliméricos naturales o sintéticos tales como materiales porosos de poli(alcohol vinílico) (PVA), materiales no tejidos y celulosa, esponjas y papeles de filtro. Estos pueden usarse solos o en combinación.

La forma y el tamaño del lecho que contiene forma marcada no están particularmente limitados, y pueden hacerse en una forma de tira que tiene un tamaño que puede colocarse en la tira. Normalmente, pueden usarse los que tienen una anchura de 1 a 10 mm, una longitud de 3 a 30 mm y un grosor de 0,5 a 2 mm. El lecho que contiene forma marcada puede colocarse sobre la tira con cinta adhesiva o el material laminado mediante el agente de fusión en caliente según sea necesario.

La tira para el inmunoensayo de la presente invención puede comprender además la parte que contiene sustrato que contiene el sustrato para la forma marcada del anticuerpo y/o antígeno. En particular, cuando la forma marcada contenida en la tira es la forma marcada enzimáticamente, es preferible adoptar una constitución de este tipo porque el sustrato para la enzima está contenido previamente en la parte que contiene sustrato para hacer que la detección sea sencilla.

Tras la detección usando la tira para el inmunoensayo, normalmente se suministra el sustrato a la tira añadiéndolo y disolviéndolo en el tampón de desarrollo que contiene la muestra. Por tanto, el sustrato también puede estar contenido en un estado en el que el sustrato está disuelto en el tampón de desarrollo. Sin embargo, en cuanto a la reducción de la cantidad del tampón de desarrollo requerida, que impide el cambio con el tiempo de los resultados de la determinación y potenciando la estabilidad en almacenamiento, es preferible contener sólo el sustrato en la tira.

El sustrato significa la sustancia unida específicamente a la enzima, y pueden seleccionarse y usarse apropiadamente las que corresponden a los marcadores. Al describir el sustrato como ejemplo cuando se usa la enzima como marcador, pueden usarse los que se unen a la enzima desarrollando color o emitiendo luz, por ejemplo sustratos de coloración, sustratos fluorescentes y sustratos luminiscentes. Los ejemplos específicos del sustrato de coloración, el sustrato fluorescente y el sustrato luminiscente pueden incluir los siguientes correspondientes a las enzimas que van a usarse.

Como sustrato de coloración, puede usarse ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) o diaminobencidina (DAB) en combinación con peróxido de hidrógeno cuando se usa peroxidasa como enzima. Cuando se usa fosfatasa alcalina, puede usarse 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP).

Mientras tanto, como sustrato fluorescente, puede usarse fosfato de 4-metilumbeliferilo (4MUP) cuando se usa fosfatasa alcalina como enzima. Cuando se usa β-D-galactosidasa, puede usarse 4-metilumbeliferil-β-D-galactosida (4MUG).

Además, como sustrato luminiscente, puede usarse una sal de sodio de 3-(2'-espiroadamantan)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)fenil-1,2-dioxetano (AMPPD) cuando se usa fosfatasa alcalina como enzima. Cuando se usa β-D-

galactosidasa, puede usarse 3-(2'-espiroadamatan)-4-metoxi-4-(3"-β-D-galactopiranosil)fenil-1,2-dioxetano (AMGPD). Cuando se usa peroxidasa, puede usarse luminol o isoluminol en combinación con peróxido de hidrógeno.

5 El contenido del sustrato puede determinarse apropiadamente dependiendo de diversas condiciones, por ejemplo, los tipos de la enzima y el sustrato que van a usarse y la muestra que va a someterse a prueba, y puede ser normalmente de 50 a 200 µg.

10 La posición de la parte que contiene sustrato sobre la tira no está particularmente limitada, y puede ser cualquier posición distinta del extremo en el que está anexada la parte de succión. Por ejemplo, la parte que contiene sustrato puede estar ubicada en el otro lado de extremo con respecto al extremo en el que está anexada la parte de succión, y preferiblemente en el otro extremo. Puede estar ubicada en la parte central (entre la parte de succión y la parte que contiene sustrato).

15 El sustrato puede contenerse en la tira para el inmunoensayo añadiendo el sustrato disuelto en una disolución a la tira u otro material absorbente y secándolo.

20 El sustrato puede estar contenido en cualquier parte de la tira, o un lecho que contiene sustrato obtenido conteniendo el sustrato en otro material absorbente también puede anexarse sobre la tira para el inmunoensayo. Cuando el sustrato está contenido como parte de la tira, el sustrato puede hacerse gotear directamente sobre la tira. Mientras tanto, cuando el sustrato está anexado como lecho que contiene sustrato, puede anexarse el lecho absorbente que contiene el sustrato. Como lecho absorbente, puede utilizarse directamente el elemento absorbente descrito en la tira mencionada anteriormente. El tamaño del lecho que contiene sustrato puede fijarse apropiadamente basándose en los tipos de la muestra, el tampón de desarrollo o los tamaños de las partes respectivas. Normalmente, pueden usarse los que tienen una anchura de 1 a 10 mm, una longitud de 10 a 50 mm y un grosor de 0,5 a 2 mm. El lecho que contiene sustrato puede anexarse a la tira con cinta adhesiva o el material laminado mediante el agente de fusión en caliente según sea necesario.

25 En la tira para el inmunoensayo, la muestra se hace gotear sobre cualquier parte de su superficie para el inmunoensayo. Un sitio en el que la muestra se hace gotear puede ser cualquier parte de la superficie de la tira, y el sitio en el que la forma marcada contenida en la tira puede unirse a la muestra puede seleccionarse apropiadamente.

30 En la tira para el inmunoensayo, es posible formar un sitio de detección para identificar si el antígeno y o el anticuerpo que va a detectarse está presente en la muestra o no.

35 El sitio de detección puede formarse inmovilizando el anticuerpo y/o antígeno correspondiente al mismo a la superficie de la tira. Puede inmovilizarse mediante enlace químico tal como enlace covalente, o absorción física. Además, el anticuerpo y/o antígeno correspondiente al antígeno y/o anticuerpo que va a detectarse se une a un portador insoluble, y éste puede estar contenido en la tira. El portador insoluble puede incluir partículas obtenidas insolubilizando la mezcla compuesta por gelatina, goma arábiga y hexametáfosfato de sodio (véase el documento JP Sho-63-29223-B), tal como látex de poliestireno, diversos eritrocitos animales y fibras de vidrio. El portador insoluble puede unirse al anticuerpo y/o antígeno mediante enlace químico o absorción física. La forma de la parte de detección puede ser de diversas formas tales como formas lineales y circulares. Entre éstas, es preferible la forma lineal formada para ortogonalizar con la dirección de ejecución, por ejemplo, la muestra, el sustrato y el tampón de desarrollo porque puede potenciarse la sensibilidad de detección.

40 El método para producir el antígeno y/o anticuerpo inmovilizado en el sitio de detección no está limitado, y pueden utilizarse los incluidos en la descripción para la parte que contiene forma marcada. Pueden inmovilizarse múltiples tipos de los antígenos y/o anticuerpos. En este caso, inmovilizando cada antígeno y/o anticuerpo en una posición diferente sobre la tira, es posible detectar de manera distintiva (por ejemplo, como dos líneas de determinación) el anticuerpo y/o antígeno correspondiente a cada antígeno y/o anticuerpo. Mientras tanto, mezclando e inmovilizando antígenos y/o anticuerpos respectivos, también es posible detectar los anticuerpos y/o antígenos correspondientes a antígenos y/o anticuerpos respectivos sin distinción.

45 La posición del sitio de detección no está particularmente limitada siempre que la posición sea la superficie de la tira, pero es preferible proporcionarla adyacente a la parte de succión.

50 Se muestra uno de los ejemplos de la tira para el inmunoensayo de la presente invención en las figuras 1 a 2. La figura 1 es una vista esquemática de un ejemplo de la tira para el inmunoensayo de la presente invención cuando se observa desde la superficie superior. En un dispositivo en la figura 1, una parte 3 de succión está colocada sobre un extremo de la tira 1, y otro extremo está dotado de una parte 4 que contiene forma marcada. Además, se proporciona un sitio 6 de detección ubicado en la región intercalada entre la parte de succión y la parte que contiene forma marcada.

55 Mientras tanto, se muestran otros ejemplos de la tira para el inmunoensayo de la presente invención cuando está anexado el lecho que contiene sustrato en las figuras 3 a 5. La figura 3 es una vista esquemática de un ejemplo de

la tira para el inmunoensayo de la presente invención cuando se observa desde la superficie superior. En el aparato en la figura 3, un extremo de la tira 1 está dotado de la parte 3 de succión, y una parte 5 que contiene sustrato como otro elemento (lecho que contiene sustrato) está colocada en otro extremo. La parte 4 que contiene forma marcada está colocada como otro elemento (lecho que contiene forma marcada) en la parte central. El sitio 6 de detección se proporciona entre la parte 4 que contiene forma marcada y la parte 3 de succión. La anchura de la parte 3 de succión es más ancha que la anchura de la tira 1, y las anchuras de la parte 4 que contiene forma marcada y la parte 5 que contiene sustrato son ligeramente más anchas que la de la tira 1.

La figura 4 es una vista esquemática de todavía otro ejemplo del aparato de inmunoensayo de la presente invención cuando se observa desde el lado. La figura 5 es una vista esquemática del aparato en la figura 4 cuando se observa desde la parte superior.

El aparato en la figura 4 tiene los mismos componentes que en la 3, pero se proporciona una cartulina 7 bajo la tira 1, y una cinta 8 adhesiva (sello) conecta entre la cartulina 7 y la tira 1 y la parte 3 de succión, entre la cartulina 7 y la tira 1 y la parte 5 que contiene sustrato y entre la parte 5 que contiene sustrato y la parte 4 que contiene forma marcada. La longitud de la cartulina 7 es ligeramente más larga que la longitud de la parte 3 de succión.

La tira para el inmunoensayo también puede usarse laminándola y fijándola sobre un elemento de soporte tal como plásticos, metales y papeles dependiendo del tipo del marcador.

En la tira para el inmunoensayo, suministrando la muestra mezclada con el tampón de desarrollo sobre la tira si es necesario, es posible examinar la presencia o ausencia del anticuerpo o antígeno deseado en la muestra. Por ejemplo, en los ejemplos en las figuras 1 y 2, la muestra diluida con el tampón de desarrollo puede suministrarse usando una pipeta en la parte que contiene forma marcada para realizar la operación posterior. En los ejemplos en las figuras 3 a 5, la parte que contiene sustrato también puede sumergirse en un recipiente que contiene el tampón de desarrollo tras el inicio de la medición.

La muestra en la presente invención significa una muestra que puede someterse al inmunoensayo. Los ejemplos de muestra pueden incluir diversas muestras biológicas tales como suero, plasma, sangre completa, orina y secreciones mucosas (fluidos de succión de la cavidad nasal, fluidos de limpieza de la faringe, fluidos de limpieza de la cavidad nasal).

El tampón de desarrollo no está particularmente limitado siempre que sea un líquido en el que el anticuerpo y el antígeno sean solubles, pueden usarse diversos tampones, y pueden estar contenidos apropiadamente tensioactivos y agentes de tamponamiento si es necesario. Los tampones que incluyen los agentes de tamponamiento pueden incluir tampón acetato, tampón borato, tampón tris-clorhidrato y tampón dietanolamina. El contenido del tampón de desarrollo y la velocidad de dilución de la muestra pueden fijarse apropiadamente dependiendo del sustrato y la composición del tampón de desarrollo.

Una tira de este tipo para el inmunoensayo de la presente invención es útil como aparato de inmunoensayo, y la presente invención también proporciona un aparato de inmunoensayo de este tipo tal como se describe en el siguiente punto (3).

(3) Aparato de inmunoensayo de la presente invención

El aparato de inmunoensayo significa el aparato para medir el antígeno y/o anticuerpo en la muestra mediante la reacción de antígeno-anticuerpo, y se caracteriza por incluir la tira mencionada anteriormente para el inmunoensayo.

El aparato de inmunoensayo de la presente invención puede adoptar el componente en el que la tira mencionada anteriormente para el inmunoensayo se aloja en un casete (bastidor o recipiente). La forma del casete puede ser la forma que soporta y protege las partes respectivas mencionadas anteriormente. En el casete, puede proporcionarse una ventana de determinación de la detección para observar la reacción de la muestra en el sitio de detección en la tira y una ventana de goteo de muestra para hacer gotear la muestra con el fin de producir el goteo de la muestra y la determinación del ensayo de la muestra.

La muestra se disuelve normalmente en el tampón de desarrollo y luego se suministra a la tira para el inmunoensayo en el casete, también puede proporcionarse en el casete una parte de suministro de tampón de desarrollo para suministrar el tampón de desarrollo a la tira para el inmunoensayo.

El tampón de desarrollo puede suministrarse a la tira sumergiendo la parte de suministro de tampón de desarrollo en el recipiente que contiene el disolvente de desarrollo tras el inicio de la medición, o usando una pipeta de goteo. Sin embargo, se proporciona por separado una parte de alojamiento de tampón de desarrollo que aloja el tampón de desarrollo, y la medición puede iniciarse rompiendo la parte de alojamiento tras el inicio de la medición.

La parte de alojamiento de tampón de desarrollo puede ser un baño de líquido que puede alojar el tampón de desarrollo, y preferiblemente tiene una estructura que puede romperse por choque para suministrar el tampón de

desarrollo a la parte de suministro de tampón de desarrollo. Por ejemplo, la parte de alojamiento de tampón de desarrollo puede tener una estructura que es un recipiente que tiene una abertura, en el que se acumula el tampón de desarrollo y la abertura está cubierta con una película rompible tal como papel metálico tal como papel de aluminio o una película de plástico fina que puede romperse fácilmente con los dedos.

Además, la posición de la parte de alojamiento de tampón de desarrollo puede ser normalmente la posición adyacente a la tira para el inmunoensayo, y es preferiblemente la posición adyacente a la parte que contiene sustrato cuando la parte que contiene sustrato se proporciona sobre la tira. Haciéndolo de este modo, el baño de líquido puede romperse y el tampón de desarrollo puede ponerse en contacto con la tira tras el inicio de la medición.

Para hacer que el suministro de tampón de desarrollo a partir de la parte de alojamiento de tampón de desarrollo a la tira sea fácil, es preferible que la parte superior de la parte de alojamiento de tampón de desarrollo esté dotada de una parte convexa, y está dispuesto un saliente para romper la película en la abertura en la parte de alojamiento de tampón de desarrollo mencionada anteriormente dentro de la parte convexa. Además, es posible adoptar una estructura en la que el lado superior de la parte de absorción de agua está dotado de una ventana de evaporación para evaporar el tampón de desarrollo. El material del casete no está particularmente limitado, y es preferiblemente un plástico para flexibilidad y facilidad de manipulación.

Cuando el aparato de inmunoensayo se prepara incluyendo la tira para el inmunoensayo en el casete, en el caso de usar la tira para el inmunoensayo cuando los elementos no están unidos con la cinta adhesiva como la forma mencionada anteriormente en la figura 3, el producto puede proporcionarse incrustando y fijando cada elemento en el casete. Mientras tanto, los elementos pueden incrustarse de manera integral en el casete conectando elementos respectivos con la cinta 8 adhesiva mostrada en la figura 4. En este caso, haciendo coincidir la anchura de la parte 3 de succión con la anchura de la tira 1, es posible hacer que la fabricación del aparato sea fácil así como aprovechar eficazmente los materiales para fabricar el producto en grandes cantidades. Dotando la cartulina 7 de orificios 7a, se vuelve fácil cargar el casete porque las clavijas en el casete se ajustan en los orificios 7a.

Un ejemplo del aparato de inmunoensayo que comprende el casete se muestra en la figura 6. En el aparato 2 en la figura 6, cuando se empuja la parte 12 convexa, se deforma la parte convexa y el saliente interno (no mostrado en la figura) rompe la parte de alojamiento de tampón de desarrollo subyacente (no mostrado en la figura) suministrando el tampón de desarrollo a la parte 5 que contiene sustrato. Se proporciona una ventana 10 de goteo para hacer gotear la muestra sobre la tira, y se proporciona una ventana 11 de detección sobre el sitio 6 de detección.

De este modo, el aparato de inmunoensayo de la presente invención puede medir el antígeno y/o anticuerpo en diversas muestras mediante la reacción de antígeno-anticuerpo. Es decir, el aparato de inmunoensayo puede usarse para los fines de examinar si el antígeno y/o anticuerpo particular está contenido en la muestra o no (detección), especificando el tipo del antígeno y/o anticuerpo contenido en la muestra (identificación) y midiendo la cantidad del antígeno y/o anticuerpo contenido en la muestra (cuantificación). Las muestras son las mismas que las muestras descritas para el lecho para el inmunoensayo.

Un ejemplo de métodos de inmunoensayo usando el aparato de inmunoensayo de la presente invención se describirá en más detalle tal como sigue.

En primer lugar, la muestra (por ejemplo, suero y similar) se suministra al aparato (por ejemplo, parte que contiene forma marcada). Cuando la muestra suministrada contiene el antígeno y/o anticuerpo sometido a la medición, este antígeno y/o anticuerpo se hace reaccionar con la forma marcada del anticuerpo y/o antígeno contenido en la tira en el aparato de inmunoensayo para formar el complejo.

Mientras tanto, cuando el tampón de desarrollo se suministra al aparato en el estado de mezclado con la muestra o separado de la muestra simultánea o secuencialmente con el suministro de muestra, el tampón de desarrollo permite que el complejo permee la tira así como que se mueva hacia el lado de la parte de succión mediante el fenómeno de capilaridad. Cuando el sustrato está contenido en la tira, el tampón de desarrollo permite que el marcador (por ejemplo, enzima) en el complejo se una al sustrato, y permite que esta forma unida se mueva hacia el lado de la parte de succión mediante el fenómeno de capilaridad. Cuando el complejo o la forma unida se mueve con el tampón de desarrollo en la tira para alcanzar el sitio de detección, el complejo o la forma unida con el sustrato y el antígeno y/o anticuerpo en la muestra se atrapan por el anticuerpo y/o antígeno inmovilizado en el sitio de detección, y permanecen en el sitio de detección. Como resultado, el complejo o la forma unida desarrolla color o emite luz. Por tanto, pueden identificarse el color o la luz en el sitio de detección. Los componentes y el tampón de desarrollo que no se atrapan en el sitio de detección se absorben en la parte de succión.

Por el contrario, cuando la muestra no contiene el antígeno y/o anticuerpo sometido a la medición, no se forma complejo con la forma marcada, por tanto, no se atrapa nada por el anticuerpo y/o antígeno inmovilizado en el sitio de detección, y la muestra y similares se absorben en la parte de succión. Por tanto, no se observa color ni luz en el sitio de detección.

El método para observar el color desarrollado o la luz emitida puede establecerse apropiadamente dependiendo del

tipo de marcador, y puede usarse un aparato de medición tal como un contador de centelleo, un colorímetro, un fluorofotómetro, un contador de fotones y una película sensibilizada así como observación visual. Por ejemplo, el método en el que se usa enzima como marcador y la presencia o ausencia del colorante (línea de determinación) producido por el sustrato que desarrolla color se mide cualitativamente mediante observación visual es sencillo. En este caso, se hace posible un análisis semicuantitativo usando un gráfico de color correspondiente a las concentraciones del anticuerpo.

Ejemplos

La presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

[Medición de la cantidad de absorción de agua en lecho de absorción con gel de sílice]

En los siguientes ejemplos 1 a 2 y ejemplos comparativos 1 a 2, se prepararon aparatos de inmunoensayo que usaban el lecho de absorción que contenía un contenido diferente de gel de sílice, y se examinó la relevancia entre el contenido en gel de sílice y la cantidad de absorción de agua en el lecho de absorción midiendo la cantidad de absorción de agua en el lecho de absorción en cada aparato.

Ejemplo 1

Se preparó un lecho de absorción (longitud: 15 mm, anchura: 5 mm, grosor: 1 mm suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.) con gel de sílice que contenía un 50% en peso de gel de sílice (% en peso seco. “%” que representa una tasa de contenido de gel de sílice en el lecho de absorción en el presente documento indica el % en peso seco). Se produjo un aparato de inmunoensayo mostrado en la figura 6 mediante laminación de este lecho de absorción en una membrana como una tira y elementos absorbentes como parte que contiene forma marcada y parte que contiene sustrato con sellos, uniendo la membrana a una cartulina y fijando ésta en un casete. Se usó una membrana de nitrocelulosa (longitud: 50 mm, anchura: 5 mm, grosor: 0,25 mm) como la tira para el inmunoensayo en el aparato de inmunoensayo. Como forma marcada, se usó un anticuerpo anti-influenza marcado con fosfatasa alcalina (Alp), se disolvió el anticuerpo en una disolución que contenía BSA (que contenía del 1 al 0,5%), se trató caseína con álcali (que contenía del 1 al 0,5%), un tensioactivo (Triton X-100) y sacarosa, se hizo gotear la disolución de anticuerpo sobre el elemento absorbente (hecho de poli(alcohol vinílico), longitud: 21 mm, anchura: 5 mm, grosor: 0,5 mm), que entonces se secó y se usó como parte que contenía forma marcada. Además, se usó sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato de sodio (BCIP, Na) 20 mM como sustrato. Se usó el tampón a pH 9,8 compuesto por 2-amino-2-metil-1-propanol 0,1 M, cloruro de magnesio 1 mM, azida de sodio al 0,05% y dodecibencenosulfonato de sodio (SDBS) al 0,001% como tampón de desarrollo. Se laminaron estos con los sellos (ARCare7815).

Se añadieron 30 μ l de una disolución diluida de muestra (tampón tris que contenía azida de sodio al 0,095%, el tensioactivo y BSA) sobre una parte de goteo de muestra, y se suministró el tampón de desarrollo empujando una parte convexa del casete. Se retiró el lecho de absorción y se pesó tras 2, 4, 6, 8, 10 y 12 minutos para calcular la diferencia del peso antes de la absorción como cantidad de absorción de agua. Se muestran en la figura 7 los cambios con el tiempo de las cantidades de absorción de agua en el lecho de absorción.

Ejemplo 2

Se realizó la prueba del mismo modo que en el ejemplo 1 excepto porque se usó uno que contenía un 70% en peso de gel de sílice (longitud: 15 mm, anchura: 5 mm, grosor: 1 mm suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.) como lecho de absorción con gel de sílice. Se muestran en la figura 7 los cambios con el tiempo de las cantidades de absorción de agua en el lecho de absorción.

Ejemplo comparativo 1

Se realizó la prueba del mismo modo que en el ejemplo 1 excepto porque se usó uno que contenía un 30% en peso de gel de sílice (longitud: 15 mm, anchura: 5 mm, grosor: 1 mm suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.) como lecho de absorción con gel de sílice. Se muestran en la figura 7 los cambios con el tiempo de las cantidades de absorción de agua en el lecho de absorción.

Ejemplo comparativo 2

Se realizó la prueba del mismo modo que en el ejemplo 1 excepto porque se usó papel de filtro para vino (nombre del producto: papel de filtro para vino, suministrado por Whatman Japan, longitud: 15 mm, anchura: 10 mm, grosor: 1 mm) en lugar del lecho de absorción con gel de sílice. Se muestran en la figura 7 los cambios con el tiempo de las cantidades de absorción de agua en el lecho de absorción.

Para las cantidades de absorción de agua en los respectivos aparatos en los ejemplos 1 a 2 y los ejemplos comparativos 1 a 2, se encontró a partir de la figura 7 que la cantidad en el aparato que usaba el lecho de absorción

que contenía un 30% en peso de gel de sílice (ejemplo comparativo 1) era más pequeña que en el aparato control (ejemplo comparativo 2), pero que la cantidad en el aparato que usaba el lecho de absorción que contenía un 50% en peso de gel de sílice (ejemplo 1) era ligeramente más grande que en el aparato control (ejemplo comparativo 2) aunque el tamaño del lecho de absorción es más pequeño que el del papel de filtro, y que la cantidad en el aparato que usaba el lecho de absorción que contenía un 70% en peso de gel de sílice (ejemplo 2) era mucho más grande que en el aparato control (ejemplo comparativo 2).

A partir de estos resultados, se ha demostrado que el aparato de inmunoensayo que usa el lecho de absorción que contiene un 50% en peso o más de gel de sílice tiene una capacidad de absorción de agua excelente y puede acortar el tiempo de detección.

[Prueba de sensibilidad del lecho de absorción que contiene gel de sílice]

En los siguientes ejemplos 3 a 4 y ejemplos comparativos 3 a 4, se prepararon aparatos de inmunoensayo que usaban un lecho de absorción que contenía un contenido diferente de gel de sílice, y se examinó la relevancia del contenido de gel de sílice y el tiempo de detección en el lecho de absorción midiendo el tiempo de detección en cada aparato.

Ejemplo 3

Se preparó un lecho de absorción con gel de sílice que contenía un 50% en peso de gel de sílice (igual que el ejemplo 1), y se encerró el laminado en un casete de color blanco para producir el aparato de inmunoensayo mostrado en la figura 6. Se produjo el aparato de inmunoensayo del mismo modo que en el ejemplo 1 usando la membrana de nitrocelulosa como tira y usando los mismos parte que contiene forma marcada, sustrato, tampón de desarrollo y sellos que los del ejemplo 1.

Se añadieron 30 μ l de una muestra obtenida diluyendo antígenos de influenza de tipo A y tipo B recombinantes con la disolución diluida de muestra en el ejemplo 1 anterior de 0,8 a 6,4 millones de veces sobre la parte de goteo de muestra, se suministró el tampón de desarrollo empujando la parte convexa del casete y se midió el tiempo hasta que la línea de determinación estaba presente en el sitio de detección. Éste era el tiempo de detección. En un estado de detección, la temperatura era de 25,1 a 25,5°C y la humedad era del 55 al 57%. Se muestra en la figura 8 el tiempo requerido para la detección (tiempo de detección).

Ejemplo 4

Se realizó la prueba del mismo modo que en el ejemplo 3 excepto porque se usó uno que contenía un 70% en peso de gel de sílice (el mismo que en el ejemplo 2) como lecho de absorción con gel de sílice. Se muestran en la figura 8 los cambios con el tiempo de las cantidades de absorción de agua en el lecho de absorción.

Ejemplo comparativo 3

Se realizó la prueba del mismo modo que en el ejemplo 3 excepto porque se usó uno que contenía un 30% en peso de gel de sílice (el mismo que en el ejemplo comparativo 1) como lecho de absorción con gel de sílice. Se muestra en la figura 8 el tiempo de detección.

Ejemplo comparativo 4

Se realizó la prueba del mismo modo que en el ejemplo 3 excepto porque se usó el papel de filtro para vino en lugar del lecho de absorción. Se muestra en la figura 8 el tiempo de detección.

Tal como resulta evidente a partir de la figura 8, el tiempo de detección en el aparato que usaba el lecho de absorción que contenía un 30% en peso de gel de sílice (ejemplo comparativo 3) se prolongó ampliamente en comparación con el aparato que usaba el papel de filtro, que era el control (ejemplo comparativo 4). Por el contrario, el tiempo de detección en el aparato que usaba el lecho de absorción que contenía un 50% en peso de gel de sílice (ejemplo 3) estaba ligeramente acortado en comparación con el control, y el tiempo de detección en el aparato que usaba el lecho de absorción que contenía un 70% en peso de gel de sílice (ejemplo 4) estaba mucho más acortado. A partir de estos resultados, se ha demostrado que el aparato de inmunoensayo que usa el lecho de absorción que contenía un 50% en peso o más de gel de sílice puede acortar el tiempo de detección.

[Anchura de lecho de absorción]

En el siguiente ejemplo 5 y los ejemplos comparativos 5 a 6, se examinó el efecto sobre el tiempo de detección por la anchura del lecho de absorción y la presencia o ausencia de gel de sílice midiendo el tiempo de detección cuando anchura del lecho de absorción se estrechó en el lecho de absorción que contenía gel de sílice o sin gel de sílice.

Ejemplo 5

Se preparó el lecho de absorción con gel de sílice que contenía un 70% en peso de gel de sílice (longitud: 15 mm, anchura: 5 mm, grosor: 1 mm suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.), y se encerró el laminado en el casete de color blanco con una cinta adhesiva acrílica tal como se muestra en la figura 4 ó 5 para producir el aparato de inmunoensayo mostrado en la figura 6.

Se añadieron 30 μ l de una disolución de muestra succionada y extraída de una cavidad nasal sobre la parte de goteo de muestra en cada aparato, se suministró el tampón de desarrollo empujando la parte convexa del casete y se midió el tiempo hasta que la línea de determinación estaba presente en el sitio de detección. Éste era el tiempo de detección.

Ejemplo comparativo 5

Se produjo un aparato de inmunoensayo similar al ejemplo 5 usando el papel de filtro para vino que tenía el mismo tamaño (longitud: 15 mm, anchura: 5 mm, grosor: 1 mm) en lugar del lecho de absorción en el ejemplo 5. Se midió el tiempo de detección en este aparato del mismo modo que en el ejemplo 5.

Ejemplo comparativo 6

Se produjo un aparato de inmunoensayo usando el papel de filtro para vino que tenía la anchura ancha (longitud: 15 mm, anchura: 5 mm, grosor: 1 mm) en lugar del lecho de absorción en el ejemplo 5 sin adherir cada elemento con el sello. Se midió el tiempo de detección en este aparato del mismo modo que en el ejemplo 5.

Se muestra en la figura 9 la comparación de los tiempos de detección entre el ejemplo 5 y el ejemplo comparativo 6, y se muestra en la figura 10 la comparación de los tiempos de detección entre el ejemplo comparativo 5 y el ejemplo comparativo 6.

Tal como se muestra en la figura 10, el tiempo de detección es más largo en el ejemplo comparativo 5 que en el ejemplo comparativo 6, lo que indica que el tiempo de detección se prolonga al estrechar la anchura cuando el lecho de absorción no contiene gel de sílice. Mientras tanto, tal como se muestra en la figura 9, el tiempo de detección es más largo en el ejemplo comparativo 6 que en el ejemplo 5. Por tanto, resulta obvio que el estrechamiento de la anchura acorta en vez de no prolongar el tiempo de detección cuando se usa el lecho de absorción que contiene gel de sílice. A partir de estos resultados, se ha demostrado que incluso cuando la anchura del lecho de absorción se estrecha a la anchura adecuada para el laminado, se obtiene un aparato de inmunoensayo que puede detectar en un corto tiempo usando el lecho de absorción que contiene gel de sílice.

[Diámetro de partícula promedio del gel de sílice]

En los siguientes ejemplos 6 a 9, se examinó el efecto sobre el tiempo de detección por el diámetro de partícula promedio del gel de sílice.

Ejemplo 6

Se preparó un lecho de absorción con gel de sílice que contenía un 70% en peso de gel de sílice que tenía el diámetro de partícula promedio en el intervalo de 3,5 a 4,5 μ m (suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.), y se produjo el aparato de inmunoensayo mostrado en la figura 6 del mismo modo que en el ejemplo 1. Se midió el tiempo de detección usando el mismo procedimiento y condiciones que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la figura 11.

Ejemplo 7

Se produjo un aparato de inmunoensayo similar al ejemplo 6 usando un lecho de absorción con gel de sílice que contenía un 70% en peso de gel de sílice que tenía el diámetro de partícula promedio en el intervalo de 13 a 14 μ m (suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.) en lugar del lecho de absorción en el ejemplo 6. Se midió el tiempo de detección en este aparato del mismo modo que en el ejemplo 6. Los resultados se muestran en la figura 11.

Ejemplo 8

Se produjo un aparato de inmunoensayo similar al ejemplo 6 usando un lecho de absorción con gel de sílice que contenía un 70% en peso de gel de sílice que tenía el diámetro de partícula promedio en el intervalo de 2,5 a 3 μ m (suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.) en lugar del lecho de absorción en el ejemplo 6. Se midió el tiempo de detección en este aparato del mismo modo que en el ejemplo 6. Los resultados se muestran en la figura 11.

Ejemplo 9

Se produjo un aparato de inmunoensayo similar al ejemplo 6 usando un lecho de absorción con gel de sílice que

contenía un 70% en peso de gel de sílice que tenía el diámetro de partícula promedio en el intervalo de 6,5 a 7,0 μm (suministrado por Azumi Filter Paper Co., Ltd.) en lugar del lecho de absorción en el ejemplo 6. Se midió el tiempo de detección en este aparato del mismo modo que en el ejemplo 6. Los resultados se muestran en la figura 11.

- 5 Tal como resulta evidente a partir de la figura 11, cualquiera de los tiempos de detección en los respectivos aparatos en los ejemplos 6 a 9 son de entre 7 y 9 minutos. Particularmente, el tiempo de detección en el ejemplo 6 (el intervalo del diámetro de partícula promedio era de 3,5 a 4,5 μm) y el ejemplo 8 (el intervalo del diámetro de partícula promedio era de 2,5 a 3,0 μm) era 7 minutos más temprano lo que es muy corto.
- 10 A partir de estos resultados, se ha demostrado que según el aparato de inmunoensayo que usa el lecho de absorción que contiene gel de sílice, la detección puede realizarse en un tiempo corto, y que el tiempo de detección puede acortarse adicionalmente usando el lecho de absorción que contiene gel de sílice que tiene el diámetro de partícula promedio en el intervalo de 4,5 μm o menos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Tira para un inmunoensayo para detectar un antígeno y/o anticuerpo en una muestra mediante una reacción de antígeno-anticuerpo, que comprende:
- una parte que contiene forma marcada que incluye una forma marcada de un anticuerpo y/o antígeno correspondiente al antígeno y/o anticuerpo que va a detectarse; y
- 10 una parte de succión compuesta por un lecho de absorción para un inmunoensayo, en la que el lecho de absorción comprende el 50% en peso o más de geles de sílice, teniendo los geles de sílice una capacidad de absorción de humedad del 30% o menos a una humedad del 60% o menos y una capacidad de absorción de humedad de 40% o más a una humedad del 90% o más.
- 15 2. Tira para un inmunoensayo según la reivindicación 1, en la que el gel de sílice tiene una capacidad de absorción de humedad del 20% o menos a una humedad del 60% o menos y una capacidad de absorción de humedad del 70% o más a una humedad del 95% o más.
- 20 3. Tira para un inmunoensayo según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el gel de sílice es gel de sílice de forma B.
4. Tira para un inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además una parte que contiene sustrato que incluye un sustrato para dicha forma marcada.
- 25 5. Tira para el inmunoensayo según la reivindicación 4, en la que dicha parte que contiene sustrato está ubicada en otro extremo con respecto a un extremo en el que está anexada la parte de succión y dicha parte que contiene forma marcada está ubicada entre la parte que contiene sustrato y la parte de succión.
- 30 6. Aparato de inmunoensayo para medir un antígeno y/o anticuerpo en una muestra mediante una reacción de antígeno-anticuerpo, que comprende la tira para el inmunoensayo según la reivindicación 1.
7. Aparato de inmunoensayo según la reivindicación 6, que comprende además una parte de suministro de tampón de desarrollo para suministrar un tampón de desarrollo a dicha tira.
- 35 8. Método de inmunoensayo que comprende:
- medir un antígeno y/o anticuerpo mediante una reacción de antígeno-anticuerpo usando la tira según la reivindicación 1.
- 40 9. Método de inmunoensayo que comprende:
- medir un antígeno y/o anticuerpo mediante una reacción de antígeno-anticuerpo usando el aparato de inmunoensayo según la reivindicación 6.

FIG.1

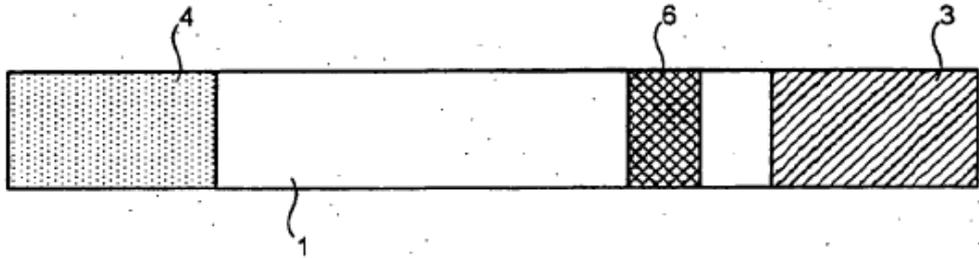


FIG.2

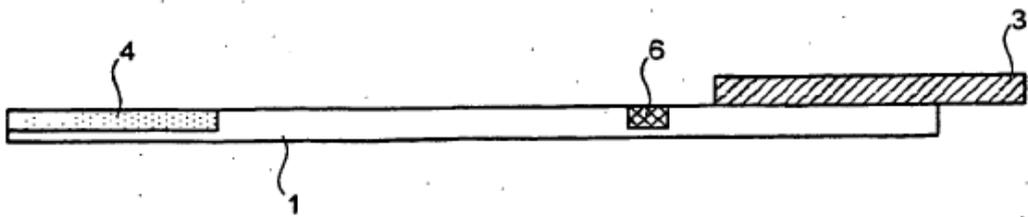


FIG.3

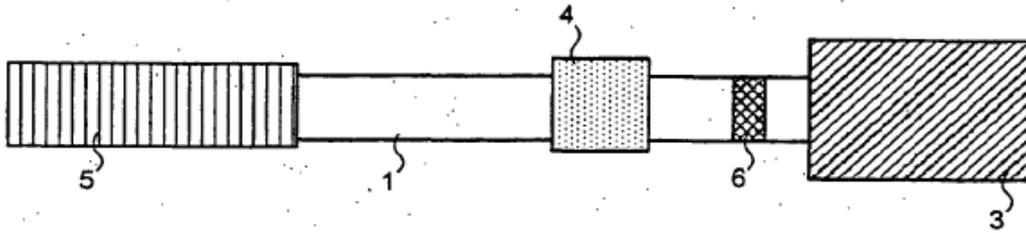


FIG.4

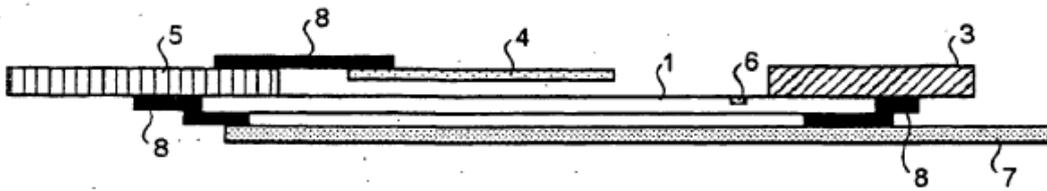


FIG.5

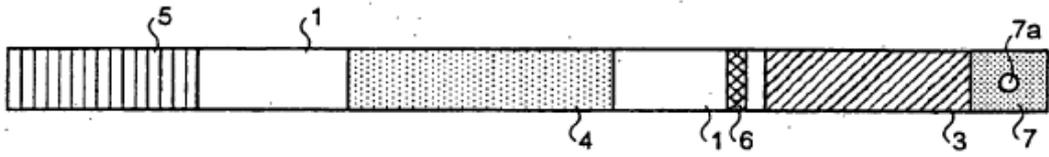


FIG.6

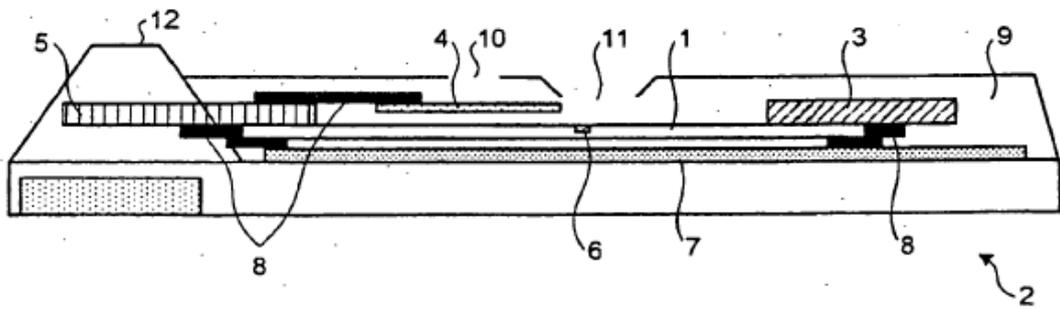


FIG.7

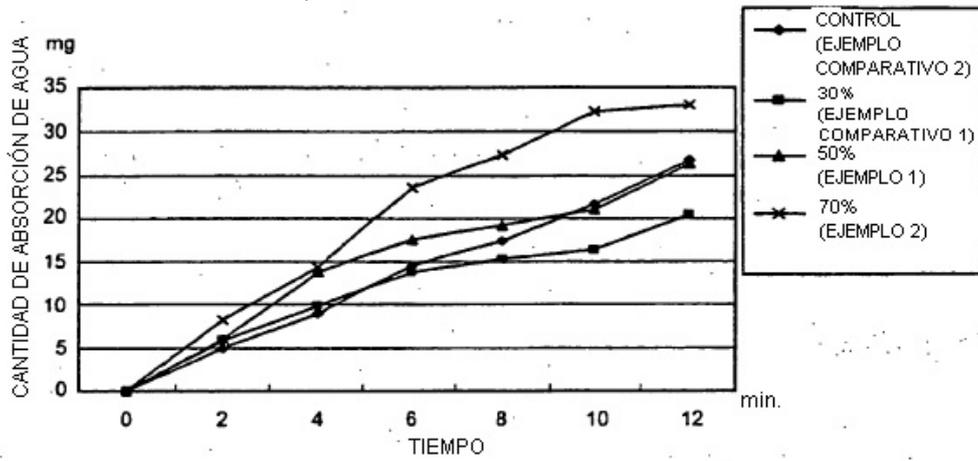


FIG.8

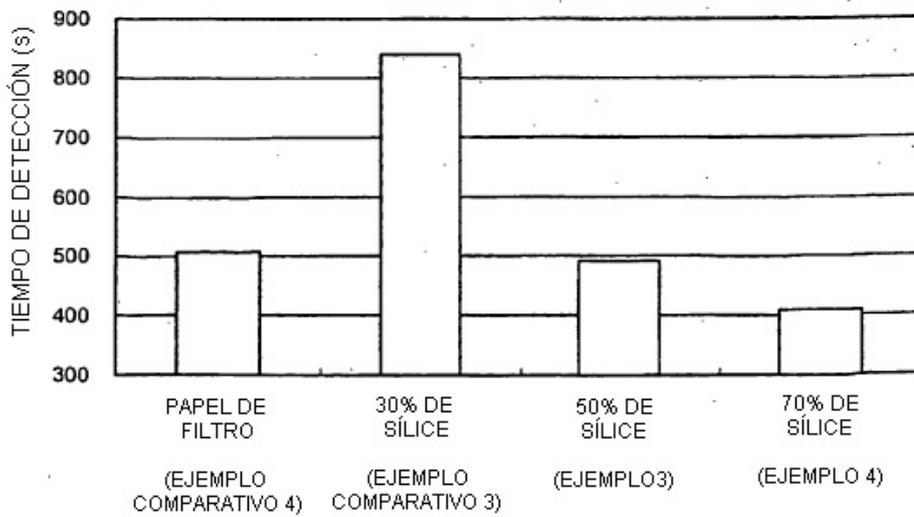


FIG.9

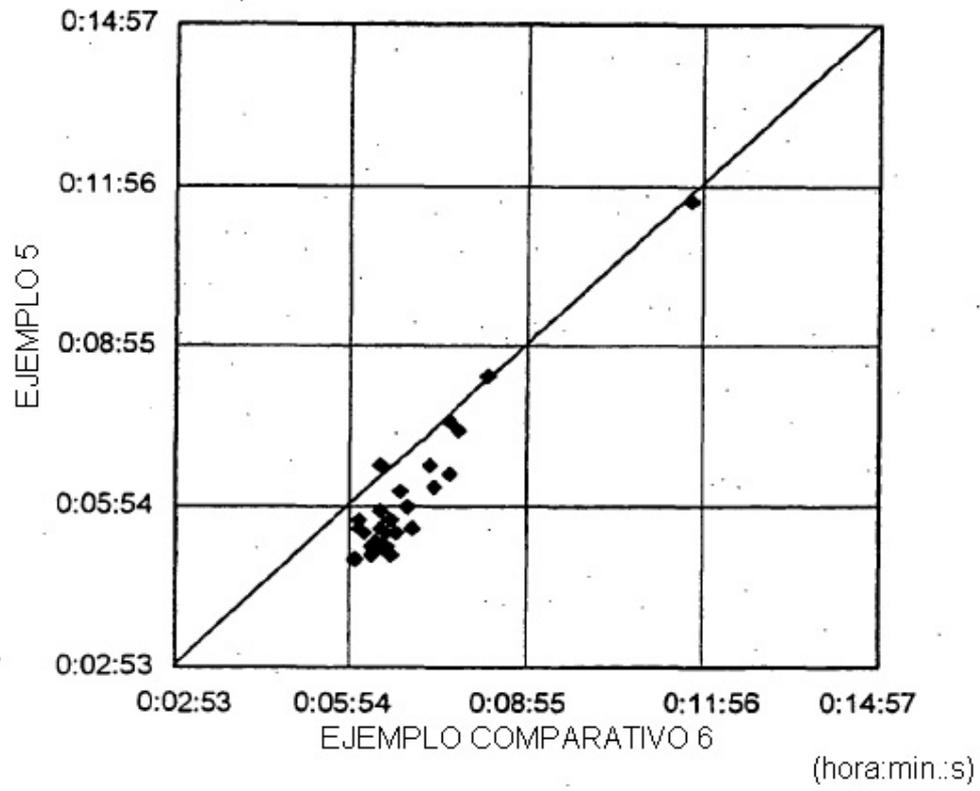


FIG.10

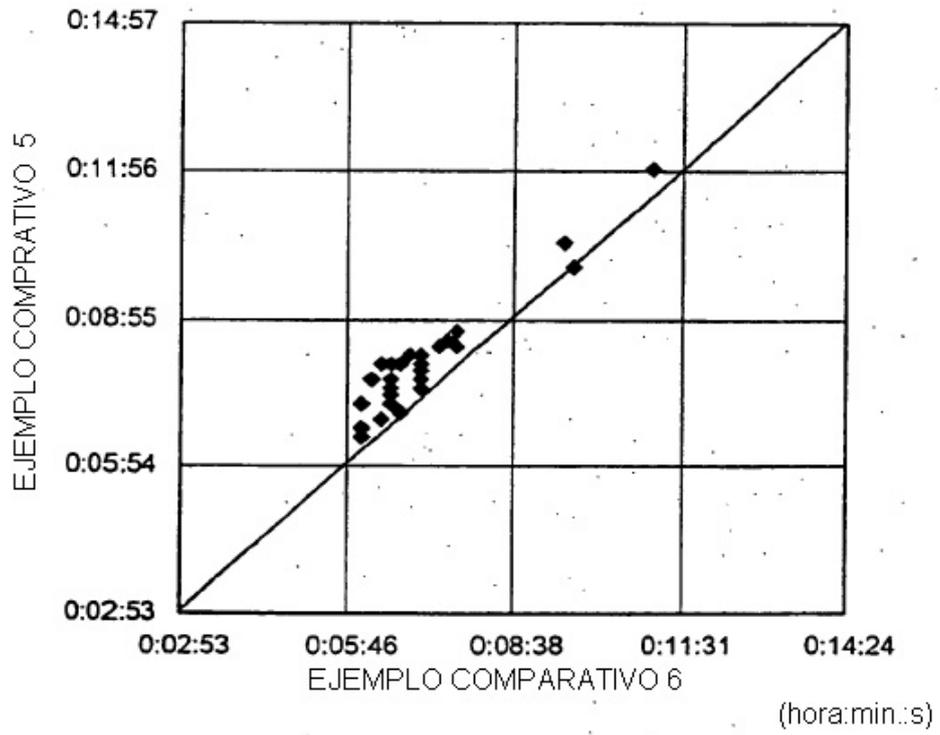


FIG.11

