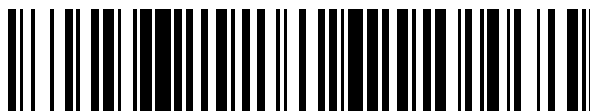


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 326**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010** **E 10748806 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013** **EP 2418486**

54 Título: **Kit de reactivo de ensayo y uso en un procedimiento para medir un analito en una muestra de ensayo**

30 Prioridad:

05.03.2009 JP 2009051514

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

28.01.2014

73 Titular/es:

DENKA SEIKEN CO., LTD. (100.0%)
4-2, Nihonbashikayabacho 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0025, JP

72 Inventor/es:

IIZUKA, MASAYUKI y
KANO, MAYUMI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 440 326 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

Kit de reactivo de ensayo y uso en un procedimiento para medir un analito en una muestra de ensayo

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un reactivo de ensayo para medir el analito en una muestra de ensayo, usando el nivel de aglutinación por suspensión de partículas que suspende partículas de vehículo insolubles que transportan una sustancia para capturar el analito como indicador, así como al suministro de un procedimiento para medir el analito en una muestra de ensayo que usa el reactivo de ensayo anterior.

TÉCNICA ANTERIOR

[0002] El procedimiento de medida de una sustancia sujeta a medición (antígeno o anticuerpo) en una muestra de ensayo, que usa un reactivo de ensayo con suspensión de partículas que suspende partículas de vehículo insolubles que transportan un anticuerpo o antígeno, que usa el nivel de aglutinación por las partículas después de reacción con la muestra de ensayo como indicador, se conoce como inmunoaglutinación y se usa ampliamente.

[0003] Se ha referido que el vehículo insoluble que transporta un anticuerpo puede dispersarse en una fase líquida con una fuerza iónica baja que tiene una concentración de NaCl no superior a una concentración prescrita, o inversamente, en una fase líquida con una fuerza iónica elevada que tiene una concentración de NaCl no inferior a una concentración prescrita.

[0004] El vehículo insoluble que transporta una proteína suspendida en un disolvente con una fuerza iónica baja que tiene una concentración de NaCl no superior a una concentración prescrita, es decir, suspendida en un disolvente que tiene una conductividad eléctrica baja, es excelente para alcanzar una buena dispensabilidad y sensibilidad. Sin embargo, puede producirse una aglutinación no específica debida a contaminación de iones por impurezas de muestras biológicas.

[0005] Se sabe que en las muestras biológicas existen interferencias que influyen en la reacción inmunológica de la sustancia diana. Para evitar la influencia de las interferencias de la reacción inmunológica se han usado ampliamente procedimientos que emplean reactivos con diversos aditivos. Por ejemplo, se conoce un procedimiento de uso de la solución de reacción para detectar una sustancia diana y la solución tampón, que es un segundo reactivo que contiene un aditivo, para evitar la influencia de las interferencias. En muchos casos, la solución tampón tiene una conductividad eléctrica (aproximadamente de 15 a 20 ms/cm) cercana a la del suero salino. En sistemas de medida que usan un vehículo insoluble de suspensión de anticuerpos en una condición de baja conductividad eléctrica, puede producirse aglutinación no específica cuando la solución de reacción se mezcla con la solución tampón durante la medida.

[0006] En inmunoaglutinación o similares, pueden usarse diversos aditivos (por ejemplo, polietilenglicol o guanidina) con el fin de aumentar la sensibilidad del reactivo. Sin embargo, si se usa un aditivo, la conductividad eléctrica aumentará y, por tanto, puede producirse aglutinación no específica cuando la solución de reacción se mezcla con la solución tampón durante la medida.

[0007] Por otra parte, en los casos en que se usa un vehículo insoluble que transporta una proteína en suspensión en un disolvente que tiene una alta conductividad eléctrica, no se produce autoaglutinación en un periodo de tiempo breve, no en un marco de varias horas. Sin embargo, la autoaglutinación tiene lugar durante almacenamiento de larga duración de varios días o varios meses o más, de manera que puede no conseguirse dicho almacenamiento.

[DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR]

[DOCUMENTOS DE PATENTE]

[0008]

[Documento de patente 1] JP-2005-351.643-A

[Documento de patente 2] JP-3.095.541-B

[Documento de patente 3] JP-57-182.168-A

[Documento de patente 4] JP-8.075.746-A

[DOCUMENTOS DISTINTOS DE PATENTE]

5

[0009]

[Documento distinto de patente 1] J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 10, nº 11, pág. 1093-1105 (1999)

10 RESUMEN DE LA INVENCION

PROBLEMAS QUE SE RESOLVERÁN MEDIANTE LA INVENCION

[0010] Un objeto de la presente invención es proporcionar un kit de reactivo de ensayo para una sustancia
15 sujeta a medición en una muestra de ensayo, usando el nivel de aglutinación por una suspensión de partículas que
suspende partículas de vehículo insolubles que transportan una sustancia para capturar la sustancia sujeta a
medición como indicador, en el que el reactivo no experimenta autoaglutinación durante el almacenamiento, y con el
que rara vez se produce aglutinación no específica durante la medida, así como proporcionar un procedimiento de
medida del analito en una muestra de ensayo.

20

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

[0011] Los autores de la invención realizaron estudios intensos para descubrir que no se produce
autoaglutinación durante la condición de almacenamiento y que la aglutinación no específica puede inhibirse durante
25 la medida formando el reactivo de ensayo en un sistema de solución binario que incluye una suspensión de
partículas y una solución tampón, haciendo también la suspensión de partículas con conductividad eléctrica inferior a
un valor específico, y haciendo la solución tampón con conductividad eléctrica superior a un valor específico que es
mayor que el de la solución tampón empleado normalmente en reactivos de ensayo, y mezclando la solución tampón
y la suspensión de partículas inmediatamente antes del inicio de la operación de medida, completando con ello la
30 presente invención.

[0012] Es decir, la presente invención proporciona un kit de reactivo de ensayo para medir un analito,
comprendiendo el reactivo al menos una Solución A que es una solución tampón que tiene una conductividad
eléctrica no inferior a 30 ms/cm; y una Solución B que tiene una conductividad eléctrica no superior a 6,5 ms/cm,
35 siendo la Solución B una suspensión de partículas que suspende partículas de vehículo insolubles que transportan
una sustancia para capturar la sustancia sujeta a medición. La presente invención también proporciona un
procedimiento de medida del analito en una muestra de ensayo usando el reactivo de ensayo anterior según la
presente invención, comprendiendo el procedimiento las etapas de mezclado de la Solución A, la Solución B y la
muestra de ensayo; y de medida del nivel de aglutinación de las partículas en la mezcla obtenida, en el que al
40 menos la Solución A y la Solución B se mezclan inmediatamente antes del inicio de una operación de medida, en el
que dicha Solución A se mezcla con dicha Solución B en una cantidad tal que no se produce aglutinación no
específica.

EFFECTOS DE LA INVENCION

45

[0013] Mediante la presente invención, dado que no se produce autoaglutinación durante el almacenamiento,
y la aglutinación no específica rara vez ocurre durante la medida, la sustancia sujeta a medición en una muestra de
ensayo puede medirse con precisión.

50 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0014]

55

La Fig. 1 muestra un modo del procedimiento de mezcla para mezclar la Solución A, la Solución B y
una muestra de ensayo cuando el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo usando un
aparato de medida automático.

La Fig. 2 muestra otro modo del procedimiento de mezcla para mezclar la Solución A, la Solución B y
una muestra de ensayo cuando el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo mediante un
aparato de medida automático usando un tubo en forma de Y.

La Fig. 3 muestra otro modo del procedimiento de mezcla para mezclar la Solución A, la Solución B y una muestra de ensayo cuando el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo usando un filtro de filtrado.

La Fig. 4 muestra una curva de calibración preparada en un Ejemplo de la presente invención.

5

MODO DE REALIZAR LA INVENCION

[0015] Tal como se describe anteriormente, el kit de reactivo de la presente invención comprende una Solución A, que es una solución tampón, y una Solución B, que es una suspensión de partículas. La Solución A y la Solución B son dos líquidos separados contenidos en diferentes recipientes. Estas soluciones se mezclan inmediatamente antes de la operación de medida. El modo de mezclado se describirá más adelante.

Solución A (solución tampón)

[0016] El agente tampón contenido en la Solución A, que es una solución tampón, puede ser un agente tampón bien conocido usado normalmente en reactivos de ensayo. Entre los ejemplos preferidos del agente tampón se incluyen aminoácidos como alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina; sales de ácidos carboxílicos como ácido cítrico, ácido maleico y ácido glutárico; sales de ácido fosfórico como fosfato de sodio e hidrogenofosfato de sodio; sales de ácido carbónico como carbonato de calcio y carbonato de magnesio; y tampón de Good. Se usan preferentemente tampón Tris, tampón de Good y tampones de fosfato, pero el agente tampón no se limita a ellos.

[0017] La conductividad eléctrica de la Solución A es no inferior a 30 ms/cm, preferentemente no inferior a 35 ms/cm. No existe un límite superior específico de la conductividad eléctrica, y la conductividad eléctrica es normalmente no superior a 200 ms/cm, preferentemente no superior a 100 ms/cm. Si se ajusta la conductividad eléctrica de la Solución A a no menos de 30 ms/cm, puede inhibirse drásticamente la aglutinación no específica durante la medida. Las soluciones tampón usadas ampliamente en los reactivos de ensayo convencionales son aquellas que tienen una conductividad eléctrica similar a la del suero salino, es decir, aquellas que tienen una conductividad eléctrica de aproximadamente 15 a 20 ms/cm. Así, uno de los rasgos característicos de la presente invención es el uso de una solución tampón que tiene una conductividad eléctrica superior a las de las soluciones tampón usadas normalmente. La conductividad eléctrica puede medirse mediante un procedimiento convencional usando un instrumento de medida de conductividad eléctrica ampliamente disponible en el comercio. La medida de la conductividad eléctrica se realiza a temperatura ambiente.

[0018] La conductividad eléctrica de la Solución A puede ajustarse a un valor arbitrario ajustando la concentración del agente tampón descrito anteriormente, o añadiendo un compuesto iónico acuoso. Entre los ejemplos del compuesto iónico acuoso se incluyen cloruros, bromuros y yoduros de metales alcalinos como sodio y potasio, y de metales alcalinotérreos como magnesio y calcio, así como sales de ácido carbónico, sales de ácido carbónico hidrogenadas, sales de ácido acético y sales de ácido sulfúrico que contienen estos metales; y alumbres. Entre ellos, NaCl es sencillo y se prefiere. Usando un instrumento de medida de conductividad eléctrica disponible comercialmente, la conductividad eléctrica de un líquido puede medirse en tiempo real, de manera que puede conseguirse fácilmente una conductividad eléctrica deseada añadiendo el compuesto iónico acuoso mientras se mide la conductividad eléctrica.

[0019] Solución B (suspensión de partículas). Tal como se describe anteriormente, en la Solución B, las partículas de vehículo insolubles que transportan una sustancia para capturar la sustancia sujeta a medición están contenidas en un estado suspendido. Las partículas suspendidas no están limitadas en absoluto, y pueden ser partículas bien conocidas usadas convencionalmente en los reactivos de ensayo.

[0020] Más en particular, la sustancia para capturar la sustancia sujeta a medición puede ser cualquier sustancia siempre y cuando pueda unirse específicamente a la sustancia sujeta a medición, es decir, una sustancia que pueda unirse a la sustancia sujeta a medición a través de una reacción de unión específica como reacción de antígeno-anticuerpo o reacción de ligando-receptor. El procedimiento en el que se usa una reacción de antígeno-anticuerpo es un inmunoensayo bien conocido denominado inmunoaglutinación. En los casos en que la sustancia sujeta a medición es un antígeno, se transporta un anticuerpo que experimenta una reacción de antígeno-anticuerpo con el antígeno, o un fragmento de unión de antígeno del mismo (por ejemplo, fragmento Fab o fragmento F(ab')₂ que conserva la capacidad de unirse con el antígeno). Incluso en los casos en que la sustancia sujeta a medición es un anticuerpo, se transporta un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno del mismo, ya que un anticuerpo es

también un antígeno. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

[0021] En los casos en que la sustancia sujeta a medición es un antígeno, los ejemplos de la sustancia sujeta a medición incluyen, pero no se limitan a: marcadores de proteínas como PCR (proteína C reactiva), antígeno prostático específico, ferritina, β -2 microglobulina, mioglobina, megalina, podocalixina, transferrina, albúmina y creatinina; diversos marcadores tumorales; lipoproteínas como LDL, HDL y TG; antígenos víricos como virus de influenza A, virus de influenza B, virus SR (VSR), rinovirus, rotavirus, norovirus, adenovirus, astrovirus, VHA, HB, VHC, VIH y VEB; antígenos de bacterias como Chlamydia trachomatis, estreptococos hemolíticos, Bordetella pertussis, Helicobacter pylori, leptospira, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii, Borrelia, Legionella, bacteria del carbunco y SARM; toxinas producidas por bacterias; antígenos lipídicos de micoplasma; hormonas peptídicas como gonadotropina coriónica humana; esteroides como hormonas esteroideas; aminos fisiológicamente activas como epinefrina y morfina; vitaminas como vitaminas B; prostaglandinas; antibióticos como tetraciclina; productos agroquímicos; y hormonas ambientales. Entre los ejemplos preferidos se incluyen antígenos como PCR, antígeno prostático específico, ferritina y β -2 microglobulina.

[0022] En los casos en que la sustancia sujeta a medición es un anticuerpo, entre los ejemplos se incluyen anticuerpos que reaccionan específicamente con el antígeno como los marcadores de proteínas descritos anteriormente, varios marcadores tumorales, lipoproteínas, antígenos víricos, antígenos bacterianos, toxinas producidas por bacterias o similares, hormonas peptídicas, esteroides, aminos fisiológicamente activas, vitaminas, antibióticos, productos agroquímicos y hormonas ambientales.

[0023] En los casos en que el analito es un antígeno, las partículas de vehículo son sensibilizadas con un anticuerpo que se une al analito. En los casos en que el analito es un anticuerpo, las partículas de vehículo son sensibilizadas con un antígeno que se une al analito. En los casos en que el analito es un ligando, las partículas de vehículo son sensibilizadas con un receptor que se une al analito. En los casos en que el analito es un receptor, las partículas de vehículo son sensibilizadas con un ligando que se une al analito.

[0024] El vehículo insoluble puede ser también un material bien conocido que se usa convencionalmente en reactivos de ensayo. Los ejemplos del mismo incluyen látex de resina hechos de polietileno o poliestireno; y partículas de óxido de aluminio, sílice, oro coloide, partículas magnéticas y similares. Entre estos vehículos insolubles, se usan preferentemente partículas de látex, especialmente partículas de látex de poliestireno.

[0025] La concentración de las partículas suspendidas en la Solución B puede seleccionarse de forma apropiada dependiendo del tipo de sustancia para capturar el analito, el tipo de analito, la concentración esperada de analito en la muestra de ensayo y así sucesivamente, y normalmente es de aproximadamente el 0,01 al 0,5%.

[0026] La conductividad eléctrica de la Solución B es no superior a 6,5 ms/cm, preferentemente no superior a 5 ms/cm. Cuando la conductividad eléctrica de la Solución B es no superior a 6,5 ms/cm, se evita la autoaglutinación de las partículas durante el almacenamiento, y la aglutinación no específica durante la medida rara vez se produce. No existe un límite inferior específico de la conductividad eléctrica, y la conductividad eléctrica es normalmente no inferior a 0,1 ms/cm. La conductividad eléctrica no superior a 6,5 ms/cm se consigue usando agua, un alcohol (por ejemplo, etanol o similar), solución de azúcares (por ejemplo, glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa) o similares como disolvente de la Solución B. Puede añadirse cloruro de sodio o un agente tampón a la Solución B en la medida en que pueda seguirse consiguiendo la conductividad eléctrica descrita anteriormente.

[0027] Con el kit de reactivo de ensayo de la presente invención, es posible emplear concurrentemente un(os) aditivo(s) como reactivos de coloración y reactivos de reacción para detectar el analito; enzimas como colesterol-oxidasa y colesterol-esterasa; tensioactivos; proteínas para estabilización de anticuerpos o inhibición de reacciones no específicas; azúcares y glicerol para ajustar la densidad relativa. Estos aditivos pueden añadirse a la Solución A o la Solución B, o a otro reactivo (otro líquido) separado de la Solución A y la Solución B.

Procedimiento de medida

[0028] El procedimiento de medida según la presente invención mediante el uso del kit de reactivo de ensayo anterior comprende las etapas de mezcla de la Solución A, la Solución B y la muestra de ensayo; y de medida del nivel de aglutinación de las partículas descritas anteriormente en la mezcla obtenida.

[0029] La muestra de ensayo no está limitada en ningún modo siempre y cuando pueda contener el antígeno, anticuerpo o similar descrito anteriormente que es el analito. Sin embargo, dado que la aglutinación no específica

durante la medida procede presumiblemente de la contaminación de los iones de los contaminantes de la muestra de ensayo, la presente invención demuestra al máximo su potencia cuando se aplica a una muestra de ensayo recogida de un ser humano o un animal, preferentemente el cuerpo humano. Entre los ejemplos de dicha muestra de ensayo se incluyen líquidos como sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, sudor, líquido linfático, saliva y jugos gástricos; heces; pelo; córnea; y uñas. En especial se emplea preferentemente sangre, suero o plasma originado de la sangre.

[0030] En relación con la mezcla de la Solución A, la Solución B y la muestra de ensayo, el orden de mezclado no está limitado siempre y cuando puedan mezclarse estos tres componentes (en los casos en que el reactivo de ensayo incluya un aditivo separado, también el aditivo). El procedimiento de mezcla incluye un procedimiento en el que los tres componentes se mezclan simultáneamente; un procedimiento en el que la muestra de ensayo se mezcla después de mezclar la Solución A y la Solución B; un procedimiento en el que la Solución B se mezcla después de mezclar la Solución A y la muestra de ensayo; y así sucesivamente. El procedimiento de aglutinación que usa un aparato de medida automático también se realiza ampliamente, y preferentemente en la presente invención puede emplearse también un aparato de medida automático disponible comercialmente. Las formas de realización de mezcla de la Solución A, la Solución B y la muestra de ensayo mediante el uso de un aparato de medida automático incluyen, por ejemplo, las mostradas en las fig. 1 y 2. En el procedimiento mostrado en la fig. 1, primero se añade el líquido inferior y después se añade el líquido superior. El procedimiento mostrado en la fig. 2 es un procedimiento que usa un tubo en forma de Y, en el que la Solución A y la Solución B se reúnen y se mezclan, y a continuación la mezcla obtenida se mezcla con la muestra de ensayo. El procedimiento mostrado en la fig. 3 es un procedimiento que usa un tubo de filtrado, en el que la Solución A se coloca en el tubo, la muestra de ensayo se coloca en el filtro, la Solución A y la muestra de ensayo se someten a filtrado con mezcla, y la mezcla resultante se vierte gota a gota en la Solución B. Se prefiere agitar la mezcla después del mezclado.

[0031] Al menos la mezcla de la Solución A con la Solución B se realiza inmediatamente antes del inicio de la operación de medida. El término "operación de medida" significa en la presente memoria descriptiva la operación de medida del grado de aglutinación de las partículas en la mezcla, y normalmente es la medida de absorbancia o turbidez. El término "inmediatamente antes" significa en la presente memoria descriptiva en un plazo de 10 minutos, preferentemente en un plazo de 5 minutos, antes del inicio de la operación de medida. Mediante la mezcla de la Solución A con la Solución B inmediatamente antes del inicio de la operación de medida, puede conseguirse prevenir la autoaglutinación durante el almacenamiento y la aglutinación no específica durante la medida. Se prefiere ajustar la temperatura de los líquidos respectivos en el momento del mezclado a la temperatura a la que se realiza la reacción, y normalmente de temperatura ambiente a 37°C.

[0032] Después de la mezcla, la reacción se lleva a cabo como en el procedimiento convencional normalmente durante aproximadamente 1 minuto a 1 hora, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos a 15 minutos. El nivel de aglutinación se mide de la misma forma que en los procedimientos convencionales, normalmente mediante un procedimiento óptico, preferentemente midiendo la absorbancia o la turbidez. El analito en la muestra de ensayo puede medirse realizando medidas para muestras estándar que tienen varias concentraciones conocidas; representando gráficamente la relación entre la concentración y el valor medido (absorbancia o similares) para preparar una curva de calibración; y aplicando el valor medido obtenido para una muestra de ensayo a la curva de calibración. Se pretende que el término "medida" incluya cualquier operación centre detección, cuantificación y semicuantificación.

[0033] A continuación la presente invención se describirá más en detalle por medio de un ejemplo. Sin embargo, la presente invención no está limitada al ejemplo mostrado seguidamente.

EJEMPLOS

50 Ejemplos 1 a 3, Ejemplos comparativos 1 a 5

[0034] Se midió la diferencia en la autoaglutinación de la suspensión de partículas (Solución B) que suspende las partículas de vehículo insolubles que transportan un proteína tal como se describe a continuación. Usando el suero salino como muestra en blanco, se evaluó la diferencia en la aglutinación no específica en condiciones de reacción que tenían conductividad eléctrica variable de la solución tampón (Solución A). Además, se evaluó la diferencia en la sensibilidad midiendo la PCR.

Materiales usados

[0035] Solución A: Se añadió cloruro de sodio a una solución tampón que contenía 100 mM Tris vigilando la conductividad eléctrica para alcanzar una conductividad eléctrica prescrita. Conductividad eléctrica: 8 ms/cm (concentración de cloruro de sodio: 50 mM, Ejemplos comparativos 1 y 5); 16 ms/cm (concentración de cloruro de sodio: 150 mM, Ejemplo comparativo 2); 35 ms/cm (concentración de cloruro de sodio: 400 mM, Ejemplo 1); 75 ms/cm (concentración de cloruro de sodio: 1.000 mM, Ejemplo 2, Ejemplos comparativos 3 y 4), 200 ms/cm (concentración de cloruro de sodio: 5.000 mM, Ejemplo 3).

[0036] Solución B: Se añadió cloruro de sodio a una solución de reacción que tenía el 0,1% de látex de poliestireno con un tamaño medio de partícula de 220 nm que transportaba 0,25 mg/ml de anticuerpo anti-PCR dispersado en el agua para conseguir la conductividad eléctrica prescrita. Conductividad eléctrica: 5 ms/cm (cloruro de sodio: 50 mM, Ejemplos 1 a 3, Ejemplos comparativos 1 y 2), 15 ms/cm (cloruro de sodio: 150 mM, Ejemplo comparativo 3), 78 ms/cm (cloruro de sodio: 1.000 mM, Ejemplos comparativos 4 y 5).

15 Procedimiento

[0037] Se midió la absorbancia inicial y la absorbancia al cabo de un mes de la Solución B para verificar la aparición de autoaglutinación.

[0038] Se usó suero salino como una muestra de ensayo en blanco, y el reactivo obtenido mezclando la Solución A y la Solución B descritas anteriormente se sometió a medición usando un analizador automático para verificar la aglutinación no específica del reactivo. Más en particular, en analizador automático HITACHI 7180 (nombre comercial), se añadieron 120 µl de la Solución A a 2,4 µl de suero fisiológico; se agitó el líquido mezclado obtenido a 37°C; se dejó en reposo la mezcla resultante durante 5 minutos; se añadieron 120 µl de la Solución B descrita anteriormente; y se mezcló adicionalmente la mezcla resultante con agitación a 37°C. Se midió la reacción de aglutinación después de 5 minutos como el cambio en la absorbancia a 570 nm.

[0039] La medida de PCR se realizó usando una solución de la muestra de ensayo que contenía 0,05 mg/dl de PCR, sometiendo el reactivo obtenido por mezclado de la Solución A y la Solución B descritas anteriormente a medida por medio del analizador automático para verificar el cambio en la absorbancia. Es decir, en analizador automático HITACHI 7180 (nombre comercial), se añadieron 120 µl de la Solución A descrita anteriormente a 2,4 µl de 0,05 mg/dl de solución PCR, se agitó el líquido mezclado obtenido a 37°C; se dejó en reposo la mezcla resultante durante 5 minutos; se añadieron 120 µl de la Solución B descrita anteriormente; y se mezcló adicionalmente la mezcla resultante con agitación a 37°C. Se midió la reacción de aglutinación después de 5 minutos como el cambio en la absorbancia a 570 nm.

Procedimiento de evaluación

[0040] En lo que se refiere a la autoaglutinación, se midieron las absorbancias de partículas de látex de poliestireno dispersadas al 0,1% y de la Solución B antes y después del almacenamiento, y se evaluó la autoaglutinación a las conductividades eléctricas respectivas de acuerdo con los criterios de evaluación mostrados a continuación.

Criterios de evaluación

[0041] Basándose en la absorbancia de la dispersión de partículas de látex de poliestireno al 0,1%:

O: la diferencia es del 15% o menos
X: la diferencia es de más del 15%

[0042] Se evaluó la aglutinación no específica durante la medida basándose en el cambio en la absorbancia del suero salino, medida mediante un analizador automático, de acuerdo con los criterios de evaluación mostrados a continuación.

55 Criterios de evaluación

[0043]

O: El cambio en la absorbancia ΔAbs multiplicado por 10.000 es no mayor que 20

X: El cambio en la absorbancia ΔAbs multiplicado por 10.000 es mayor que 20

Medida de PCR

- 5 **[0044]** Se midió la PCR calculando la diferencia entre el cambio en la absorbancia del suero salino, que es una muestra de ensayo en blanco, y el cambio en la absorbancia de 0,05 mg/dl de solución de PCR, y comparando la sensibilidad.

Medida de la conductividad eléctrica

10

- [0045]** Se midieron las conductividades eléctricas de la Solución A y la Solución B usando el instrumento de medida de conductividad eléctrica CM-60G producido por TOA ELECTRONICS LTD. (electrodo: CT-57101B, temperatura 25°C).

15 Resultados

- [0046]** Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

[0047]

20

Tabla 1

Conductividad eléctrica de la solución B (ms/cm)		5					15	78
Absorbancia (Abs.)	Inicial	1,37					2,48	1,38
Diferencia en absorbancia de dispersión de látex (%)		+10%					+98%	+10%
Absorbancia (Abs.)	1 mes más tarde	1,39					2,50	2,81
Diferencia en absorbancia de dispersión de látex (%)		+11%					+100%	+115%
Valoración: autoaglutinación o: no x: sí		o					x	x
Conductividad eléctrica de la solución A (ms/cm)	8	16	35	75	200	75	75	8
Cambio en la absorbancia durante la medida de suero fisiológico (Δabs.x10.000)	443	2.202	2	-5	-3	5	-2	7
Valoración: aglutinación no específica o: no x: sí	x	x	o	o	o	o	o	o
Cambio en la absorbancia durante la medida de solución PCR 0,05 mg/dl (Δabs.x10.000)	-	-	1.017	443	169	118	60	144
Diferencia	-	-	1.019	448	166	123	58	151
Valoración final: o: buena x: inaceptable	x	x	o	o	o	x	x	x
	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo comparativo 5

[0048] Tal como se muestra en la Tabla 1, en los Ejemplos comparativos 3 a 5 en los que la conductividad eléctrica de la Solución B es mayor que el intervalo definido en la presente invención, se produjo autoaglutinación 5 después de almacenamiento durante 1 mes (en el Ejemplo comparativo 3, la autoaglutinación se produjo inmediatamente después del mezclado). En los Ejemplos comparativos 1 y 2 en los que la conductividad eléctrica de la Solución A es menor que el intervalo definido en la presente invención, la absorbancia cambió incluso cuando se sometió a la medida el suero salino, es decir, se produjo aglutinación no específica.

10 **[0049]** Con los Ejemplos 1 a 3 y los Ejemplos comparativos 3 a 5 en los que no se produjo aglutinación no específica, se comparó el cambio en la absorbancia cuando se sometieron a la medida 0,05 mg/dl de solución PCR. Los Ejemplos 1 a 3 mostraron un cambio mayor en la absorbancia que los Ejemplos comparativos 3 a 5. En el Ejemplo 2 y el Ejemplo comparativo 5, las conductividades eléctricas de la Solución A y la Solución B se ajustaron casi opuestas entre sí, de manera que las conductividades eléctricas finales fueron aproximadamente iguales. Sin

embargo, el Ejemplo 2 en el que la conductividad eléctrica se ajustó como inferior en la Solución B que en la Solución A según la presente invención mostró una absorbancia más alta.

[0050] Así, con el kit de reactivo de ensayo comprendiendo al menos la Solución A, que es una solución tampón que tiene la conductividad eléctrica definida en la presente invención, y la Solución B y por el procedimiento de medida de la presente invención, puede evitarse la autoaglutinación de las partículas de látex en la Solución B, consiguiendo con ello una estabilidad excelente durante el almacenamiento. Además, se evitó la aglutinación no específica y se obtuvo una medida con alta sensibilidad.

10 Ejemplo 3

Preparación de la curva de calibración

[0051] Usando el reactivo del Ejemplo 2, se realizaron medidas usando soluciones de PCR estándar que tenían diversas concentraciones de la manera descrita anteriormente para realizar la calibración. La relación entre el cambio obtenido en la absorbancia y la concentración PCR se muestra en la fig. 4.

[0052] Tal como se muestra en la fig. 4, dado que el cambio en la absorbancia depende de la concentración PCR, se demostró que la PCR puede cuantificarse usando este reactivo.

20 Ejemplo 4

Medida de la muestra de suero

[0053] Usando el reactivo del Ejemplo 2, se realizaron medidas de PCR para una muestra de suero de la manera descrita anteriormente. Las medidas se repitieron 20 veces y se investigó la reproducibilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[0054]

30

Tabla 2

Tiempo de medida	Absorbancia
1	0,101
2	0,101
3	0,105
4	0,101
5	0,103
6	0,102
7	0,104
8	0,103
9	0,101
10	0,103
11	0,102
12	0,105
13	0,104
14	0,104
15	0,103
16	0,105
17	0,101
18	0,105
19	0,102
20	0,101
Media	0,103
Desviación típica	0,002
CV	1,50%

[0055] Tal como se muestra en la Tabla 2, los resultados de la medida muestran que la reproducibilidad de la muestra de suero real, obtenida por el procedimiento de la presente invención, fue muy alta.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de reactivo de ensayo para medir un analito, comprendiendo dicho kit al menos una Solución A que es una solución tampón que tiene una conductividad eléctrica no inferior a 30 mS/cm; y una Solución B que
5 tiene una conductividad eléctrica no superior a 6,5 mS/cm, siendo dicha Solución B una suspensión de partículas que suspende partículas de vehículo insolubles que transportan una sustancia para capturar el analito.
2. El kit de reactivo de ensayo según la reivindicación 1, en el que dicha Solución A tiene una conductividad eléctrica no superior a 200 mS/cm.
10
3. El kit de reactivo de ensayo según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha sustancia para capturar la sustancia sujeta a medición es un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno del mismo, o un antígeno.
4. El kit de reactivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas
15 partículas de vehículo insolubles son partículas de látex.
5. El kit de reactivo de ensayo según la reivindicación 4, en el que dichas partículas de látex son partículas de látex de poliestireno.
- 20 6. Un procedimiento de medida de una sustancia sujeta a medición en una muestra de ensayo que usa el kit de reactivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de mezclado de dicha Solución A, dicha Solución B y dicha muestra de ensayo; y de medida del nivel de aglutinación de las partículas en la mezcla obtenida; en el que al menos dicha Solución A y dicha Solución B se mezclan inmediatamente antes del inicio de la operación de medida, en el que dicha Solución A se mezcla con dicha
25 Solución B en una cantidad tal que no se produce una aglutinación no específica.
7. El procedimiento de medida según la reivindicación 6, en el que dicha muestra de ensayo es orina, líquido cefalorraquídeo o heces.
- 30 8. El procedimiento de medida según la reivindicación 6, en el que dicha muestra de ensayo es sangre, suero o plasma sanguíneo.

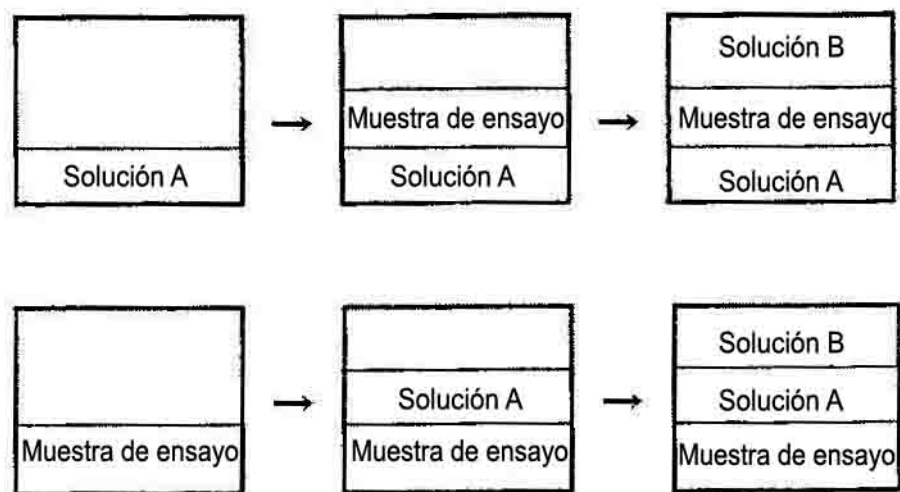


Fig.1

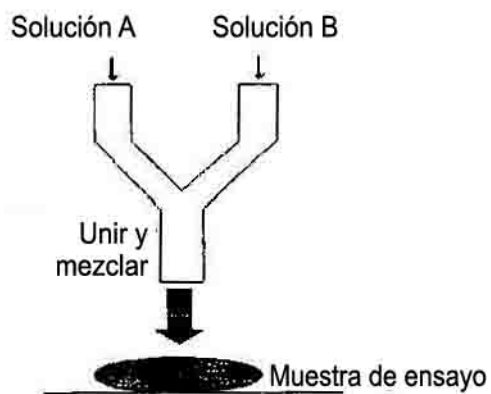


Fig.2

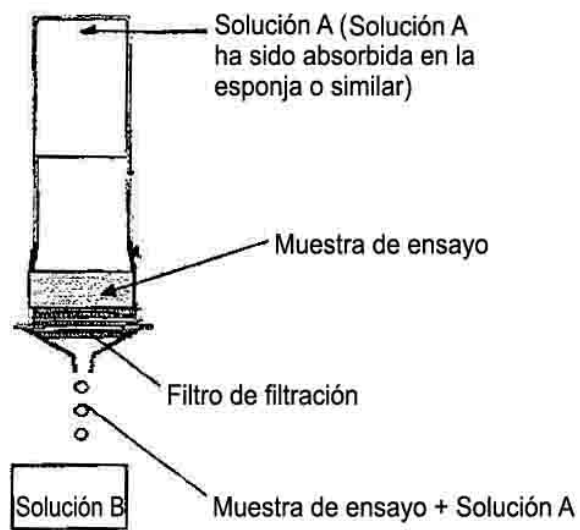


Fig.3

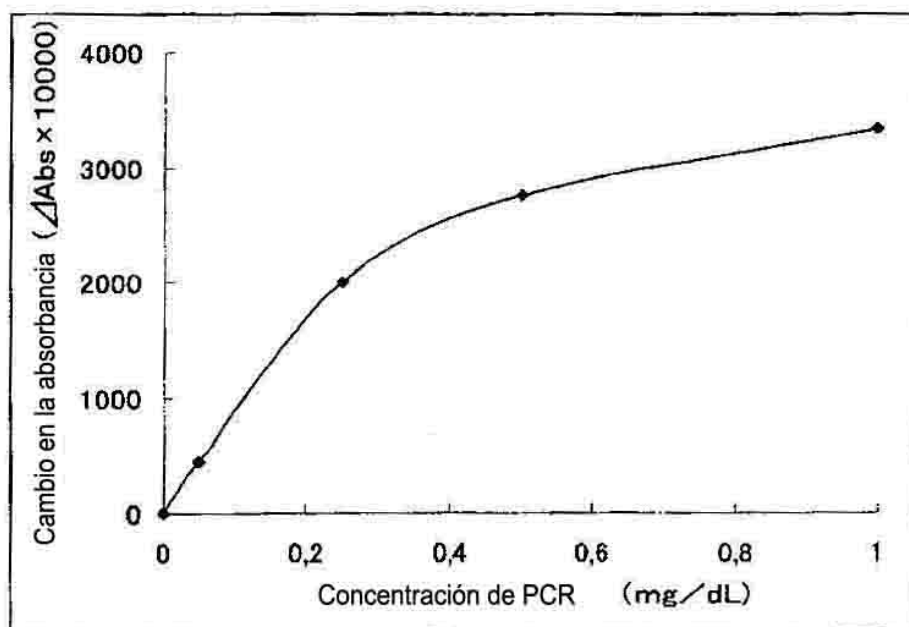


Fig.4