

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 874**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2009 PCT/JP2009/064623**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10021372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009 E 09808308 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2325640**

54 Título: **Dispositivo de prueba para ensayo de membrana que comprende una sección de presentación visual de referencia**

30 Prioridad:

22.08.2008 JP 2008214226

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

20.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MAEGAWA TSUNEO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 625 874 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

Dispositivo de prueba para ensayo de membrana que comprende una sección de presentación visual de referencia

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un dispositivo de prueba para ensayo de membrana usando una reacción de unión específica.

10 Antecedentes de la técnica

En los últimos años, se han usado cada vez más dispositivos de prueba basados en principios de medición de reacciones de unión específica, que realmente no requieren que los usuarios realicen procedimientos especializados y que requieren mucho tiempo, para pruebas en diversos campos relacionados principalmente con diagnóstico clínico, análisis medioambiental y control de la higienización de alimentos. Hay diversos tipos de dispositivos de prueba basados en principios de medición de reacciones de unión específica. De estos, se han usado ampliamente dispositivos de prueba de tipo de flujo lateral y de flujo transversal para ensayo de membrana.

En una configuración, un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral comúnmente usado es en una forma a modo de tira y comprende un portador de membrana porosa dentro de la cual puede transferirse un líquido mediante acción capilar. Se proporciona una sección de presentación visual de detección sobre la que se ha inmovilizado una sustancia capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse (reactivo de captura) a una parte de tal portador de membrana. Además, se proporciona una sustancia capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse que se ha marcado con una sustancia de marcaje que comprende una enzima, tal como peroxidasa o partículas colorantes, tales como partículas coloidales de oro (reactivo marcado) aguas arriba del portador de membrana de una tira de una manera tal que puede transferirse dentro del portador de membrana mediante acción capilar. Por ejemplo, cuando una reacción de unión específica es una reacción de antígeno-anticuerpo en la que un antígeno es la sustancia que va a detectarse, se usa un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse como reactivo de captura y se usa un anticuerpo marcado que puede unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse como reactivo marcado. En tal caso, cuando se suministra una muestra líquida a un sitio ubicado aguas arriba de una tira en donde se ha proporcionado un reactivo marcado, la muestra líquida entra en contacto con el reactivo marcado, dando como resultado la disolución o dispersión del reactivo marcado. Si está presente una sustancia que va a detectarse en la muestra líquida, el reactivo marcado disuelto o dispersado se une a la sustancia, de manera que se forma un complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse". El complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse" se transfiere adicionalmente aguas abajo de la tira y llega a una sección de presentación visual de detección. En la sección de presentación visual de detección, el complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse" se captura mediante un reactivo de captura en la sección de presentación visual de detección, de manera que se forma un complejo de intercalación de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse-reactivo de captura". Entonces, la sustancia de marcaje del reactivo marcado que constituye tal complejo de intercalación en la sección de presentación visual de detección se observa visualmente. La detección se lleva a cabo de una manera arbitraria, tal como desarrollo de color para la determinación de la presencia o ausencia de una sustancia que va a detectarse (véanse los documentos de patente 1 a 4).

En una configuración, un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal comúnmente usado comprende un portador de membrana porosa a través del que puede pasar líquido. Se proporciona una sección de presentación visual de detección sobre la que se ha inmovilizado una sustancia capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse (reactivo de captura) a una porción de la superficie superior de tal portador de membrana y se proporciona un medio de absorción de agua sobre la superficie inferior del portador de membrana. Por ejemplo, cuando una reacción de unión específica es una reacción de antígeno-anticuerpo en la que un antígeno es la sustancia que va a detectarse, se ha inmovilizado un anticuerpo que sirve como reactivo de captura capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse en una parte de la superficie superior del portador de membrana. En tal caso, cuando se suministra una muestra líquida a la superficie superior de un portador de membrana, la muestra líquida pasa a través del portador de membrana de modo que se absorbe mediante un medio de absorción de agua. Si una sustancia que va a detectarse está presente en una muestra, la sustancia que va a detectarse se captura mediante el reactivo de captura inmovilizado en la sección de presentación visual de detección proporcionado a la superficie superior del portador de membrana de manera que se forma un complejo de "sustancia que va a detectarse-reactivo de captura" en la sección de presentación visual de detección. Posteriormente, se suministra un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse que se ha marcado con una sustancia de marcaje que comprende una enzima tal como peroxidasa o partículas colorantes tales como partículas coloidales metálicas (reactivo marcado) a la superficie superior del portador de membrana. Por tanto, se permite que el anticuerpo se una a la sustancia que va a detectarse que se ha capturado en la sección de presentación visual de detección. Por consiguiente, se forma un complejo de intercalación de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse-reactivo de captura" en la sección de presentación visual de detección. Entonces, se observa visualmente la sustancia de marcaje del reactivo marcado que constituye tal complejo de intercalación en la sección de presentación visual de detección. La detección se lleva a cabo de una manera arbitraria tal como

desarrollo de color para la determinación de la presencia o ausencia de una sustancia que va a detectarse (véanse los documentos de patente 5 a 7).

5 A los dispositivos de prueba anteriores se les proporciona una sección de presentación visual de referencia que presenta visualmente resultados de prueba de referencia que indican la finalización apropiada de la prueba a un operario. Cuando la sustancia que va a detectarse no está presente en la muestra, la sección de presentación visual de referencia de este tipo indica el paso de la muestra y el reactivo marcado a través del portador de membrana, incluso si no se detecta la sustancia de marcaje en la sección de presentación visual de detección. Por ejemplo, en un caso en el que la sustancia que va a detectarse no se detecta en la sección de presentación visual de detección, si puede confirmarse el paso de la muestra y el reactivo marcado a través del portador de membrana en la sección de presentación visual de referencia, se verifica la finalización apropiada de la prueba. Por otro lado, si no puede confirmarse el paso de la muestra y el reactivo marcado a través del portador de membrana o la tira en la sección de presentación visual de referencia, puede considerarse que hay un fallo relacionado con la muestra o el reactivo marcado debido al mismo motivo. Esto indica la finalización inapropiada de la prueba. En tal caso, los resultados de prueba obtenidos se consideran inválidos. Entonces, la muestra vuelve a someterse a prueba.

20 En muchos casos, se ha usado un dispositivo de prueba que comprende una sección de presentación visual de referencia que permite una reacción de antígeno-anticuerpo con un reactivo marcado. Por ejemplo, se inmoviliza una sustancia idéntica a una sustancia que va a detectarse o una sustancia que tiene reactividad específica inmunológica frente a un reactivo marcado que es idéntica a la de una sustancia que va a detectarse en una sección de presentación visual de referencia de un portador de membrana (véase el documento de patente 8). Sin embargo, es probable que una prueba de referencia que usa una reacción de antígeno-anticuerpo se vea influida por la cantidad de antígeno contenido en la muestra, los tipos de sustancias foráneas, el pH y otros factores. Esto da como resultado escasa sensibilidad de presentación visual y presentación visual poco nítida en una sección de presentación visual de referencia en algunos casos. Por tanto, se ha esperado un dispositivo de prueba provisto de una sección de presentación visual de referencia que muestre una estabilidad mejorada.

30 Existe una invención de un dispositivo de prueba en el que se usa un indicador o formador de color en una sección de presentación visual de referencia que usa una reacción distinta de una reacción de antígeno-anticuerpo frente a un reactivo marcado. Por ejemplo, existe un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral provisto de una sección de presentación visual de referencia, en el que la sección de presentación visual de referencia está configurada de manera que indica la finalización de la reacción permitiendo que el papel de filtro absorba un formador de color que comprende verde de bromocresol, 2,5-dinitrofenol o azul de bromofenol y secando el papel de filtro (véase el documento de patente 9). En este caso, el desarrollo de color tiene lugar cuando el formador de color se humedece con agua, indicando la finalización de la reacción. Sin embargo, en un caso de este método, el desarrollo de color normal de un formador de color no tiene lugar dependiendo del pH de la muestra. En otro caso, incluso si tiene lugar el desarrollo de color normal, el formador de color fluye hacia fuera con la muestra líquida cuando la muestra pasa a través de la sección de presentación visual de referencia. Por tanto, no puede llevarse a cabo de manera estable una prueba de referencia. Además, existe un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral en el que la prueba de referencia se lleva a cabo de manera que la finalización de la reacción se indica permitiendo que el papel de filtro absorba directamente un colorante usado como indicador que contiene benzopurpurina 4B o rojo Congo para teñir (véase el documento de patente 10). Sin embargo, en este método, se usa papel de filtro para retener el indicador y por tanto es necesario incorporar papel de filtro en el dispositivo de prueba. Por tanto, el número de partes componentes del dispositivo de prueba aumenta, dando como resultado un montaje complicado. Además, existe una invención que se ha realizado en vista de los puntos problemáticos de las invenciones divulgadas en los documentos de patente 9 y 10. La invención se refiere a un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral en el que la prueba de referencia se lleva a cabo de manera que la finalización de la reacción se indica permitiendo que el portador de membrana absorba un indicador que comprende un colorante ácido (que contiene al menos un elemento seleccionado de entre eosina B, eosina Y, floxina B y azul de bromofenol) disuelto en una disolución de alcohol inferior que contiene ácido y secando el portador de membrana (véase el documento de patente 11). Sin embargo, en caso de que las pruebas de referencia anteriores usen un indicador o formador de color, la finalización de la reacción puede confirmarse cuando una muestra líquida ha pasado a través de un portador de membrana de una manera apropiada. Sin embargo, el paso de un reactivo marcado a través de un portador de membrana de una manera apropiada no puede verificarse.

55 El documento de patente 12 describe un dispositivo de flujo lateral que incluye una zona de control que comprende polietilenimina para inmovilizar conjugados de sondas o sondas que migran a las líneas de control sin analito, situándolos de ese modo para generar una señal de control que indica la finalización apropiada de la prueba.

60 Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 7-78503 B (1995)

Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 7-36017 B (1995)

Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 6-27738 B (1994)

65 Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 1-244370 A (1989)

Documento de patente 5: Publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 7-34016 B (1995)

Documento de patente 6: Publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 7-113637 B (1995)

Documento de patente 7: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 3-118473 A (1991)

Documento de patente 8: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2007-333426 A

Documento de patente 9: Publicación de patente japonesa (Kokai) n. 4-353764 A (1992)

Documento de patente 10: Patente japonesa n.º 2942087

Documento de patente 11: Patente japonesa n.º 3385377

Documento de patente 12: US 2003/0119203

Divulgación de la invención

Problema a solucionar mediante la invención

Se usa una reacción de antígeno-anticuerpo provocada por un anticuerpo marcado en secciones de presentación visual de referencia en muchos dispositivos de prueba convencionales para ensayo de membrana que implica una reacción de unión específica. Es probable que una reacción de antígeno-anticuerpo se vea influida por la cantidad de antígeno contenido en la muestra, los tipos de sustancias foráneas, el pH y otros factores. Esto da como resultado escasa sensibilidad de presentación visual y presentación visual poco nítida en secciones de presentación visual de referencia en algunos casos. Además, una sección de presentación visual de referencia sobre la que se usa un indicador o formador de color no puede demostrar el paso de un anticuerpo marcado a través de un portador de membrana de una manera apropiada. La presente invención se ha realizado en vista de los problemas convencionales. Un objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo de prueba provisto de una sección de presentación visual de referencia que indica rápida y claramente la finalización apropiada de la prueba con precisión y estabilidad mejoradas.

Medios para solucionar el problema

Como resultado de estudios intensivos de un medio para lograr el objetivo anterior, los presentes inventores encontraron que el uso de una sustancia catiónica en una sección de presentación visual de referencia para ensayo de membrana que implica una reacción de unión específica permite una presentación visual rápida y nítida de resultados de prueba de referencia, logrando de ese modo la implementación de una prueba de referencia con estabilidad mejorada. Esto ha conducido a la finalización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención se define en su sentido más amplio mediante las reivindicaciones adjuntas.

[1] Un dispositivo de prueba para ensayo de membrana que usa una reacción de unión específica de una sustancia que va a detectarse con un reactivo de captura inmovilizado sobre un portador de membrana y un reactivo marcado con una sustancia de marcaje, siendo el reactivo una sustancia aniónica o un anfolito que está cargado negativamente en condiciones básicas, que comprende una sección de presentación visual de referencia para indicar la finalización apropiada de la prueba sobre la que se ha inmovilizado un polímero catiónico para capturar un reactivo marcado, en el que el polímero catiónico es un compuesto de polímero que tiene una densidad de carga catiónica de 0,4 meq/g a 21 meq/g, y un peso molecular promedio de 300 a 5.000.000, en el que el polímero catiónico es polialilamina, en el que el dispositivo de prueba es uno dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral, y en el que la sección de presentación visual de referencia para indicar la finalización apropiada de la prueba está configurada de manera que está situada aguas abajo de una sección de presentación visual de detección sobre la que se ha inmovilizado un reactivo de captura. [2] El dispositivo de prueba según [1], en el que la sección de presentación visual de referencia está configurada para permitir que el portador de membrana absorba el polímero catiónico y seque la membrana. [3] El dispositivo de prueba según [1] o [2], en el que la reacción de unión específica es una reacción de antígeno-anticuerpo. [4] Un método para confirmar la finalización apropiada de una prueba para ensayo de membrana que usa el dispositivo de prueba según cualquiera de [1] a [3], usando el método una reacción de unión específica de una sustancia que va a detectarse con el reactivo de captura inmovilizado sobre el portador de membrana y el reactivo marcado con la sustancia de marcaje, mediante lo cual puede confirmarse la finalización apropiada de la prueba cuando se detecta el marcaje del reactivo marcado en la sección de presentación visual de referencia sobre la membrana permitiendo que el reactivo marcado se una al polímero catiónico inmovilizado en la sección de presentación visual de referencia.

Esta descripción incluye parte o todo el contenido divulgado en la descripción y/o dibujos de la solicitud de patente japonesa n.º 2008-214226, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Efectos de la invención

5 Según la presente invención, los resultados de prueba de referencia pueden presentarse visualmente de manera rápida y nítida sin sustancialmente influencia debida a la cantidad de antígeno contenido en la muestra, los tipos de sustancias foráneas, el pH y otros factores. Por tanto, puede proporcionarse un dispositivo de prueba que comprende una sección de presentación visual de referencia con precisión y estabilidad mejoradas en comparación con casos que implican métodos convencionales.

10 Además, puede proporcionarse un dispositivo de prueba fácil de producir que comprende una sección de presentación visual de referencia para presentar visualmente resultados más rápida y claramente que en casos que implican métodos convencionales con el uso de poliallilamina económica como sustancia catiónica.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra una vista desde arriba y una vista en sección transversal de un equipo de prueba de tipo de flujo lateral en una realización de la presente invención.

20 La figura 2 muestra una vista desde arriba y una vista en sección transversal de un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal (modelo 1).

La figura 3 muestra una vista desde arriba y una vista en sección transversal de un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal (modelo 2).

25 Descripción de números de referencia

1: Lámina de soporte

2: Portador de membrana

30 3: Elemento impregnado

4: Elemento de suministro de muestra

35 5: Elemento de absorción de agua

6: Sección de presentación visual de detección

7: Sección de presentación visual de referencia

40 8: Placa Petri de plástico

9: Lecho absorbente de agua

45 10: Portador de membrana

11: Sección de presentación visual de detección

12: Sección de presentación visual de referencia

50 a: Sección de presentación visual de detección de tipo A

b: Sección de presentación visual de detección de tipo B

55 c: Sección de presentación visual de referencia

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describe en detalle a continuación.

60 La presente invención se refiere a un dispositivo de prueba para ensayo de membrana basado en principios de medición de una reacción de unión específica con una sustancia que va a detectarse, en el que se usa una sustancia catiónica para una sección de presentación visual de referencia situada sobre una membrana que sirve como portador de membrana. Un dispositivo de prueba contiene un reactivo de captura capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse y un reactivo marcado capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse que está marcada con una sustancia de marcaje. La sustancia que va a detectarse

forma un complejo de intercalación de “reactivo marcado-sustancia que va a detectarse-reactivo de captura” con un reactivo de captura y un reactivo marcado proporcionados en una sección de presentación visual de detección de un dispositivo de prueba. Además, el dispositivo de prueba está provisto de una sección de presentación visual de referencia para presentar visualmente la finalización apropiada de la prueba a un operario. El operario puede confirmar la implementación y finalización apropiadas de la prueba observando la sección de presentación visual de referencia. La sección de presentación visual de referencia puede denominarse “sección de presentación visual de la finalización de la reacción” o “sección de validación”. El término “unión específica” usado en la presente invención indica una reactividad selectiva entre dos sustancias. Por ejemplo, el término indica una reacción inmunológica específica tal como una reacción de antígeno-anticuerpo, una reacción específica tal como una reacción entre un receptor y su ligando, o unión específica. Ejemplos de tal dispositivo de prueba descrito son un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal y un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral. En un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal, un analito pasa a través de la membrana descrita anteriormente. En un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral, se revela un analito y se transfiere a lo largo de una membrana. El término “ensayo de membrana” se refiere a un ensayo en el que al menos una etapa de una reacción se realiza sobre un soporte de tipo membrana de manera que la unión específica anterior tiene lugar sobre el soporte.

Los ejemplos de una sustancia que va a detectarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a: virus tales como virus influenza, adenovirus, virus RS, VHA, VHB, VHC, VIH, VEB, norovirus, rotavirus y parvovirus, o sus componentes o anticuerpos; bacterias tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Chlamydia trachomatis*, *Hemolytic streptococcus*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Borrelia*, ántrax y MRSA, o sus componentes o anticuerpos; sustancias tales como lípido de micoplasmas, transferrina humana, albúmina humana, inmunoglobulina humana, microglobulina, CRP, troponina, β -glucano y RF, o sus componentes o anticuerpos; hormonas peptídicas tales como gonadotropina coriónica humana o sus anticuerpos; esteroides tales como hormonas esteroides o sus anticuerpos; aminas fisiológicamente activas tales como epinefrina y morfina o sus anticuerpos; vitaminas tales como vitamina B o sus anticuerpos; prostaglandinas o sus anticuerpos; antibióticos tales como tetraciclina o sus anticuerpos; toxinas producidas por bacterias y similares o sus anticuerpos; una variedad de marcadores tumorales o sus anticuerpos; agroquímicos o sus anticuerpos; y secuencias de polinucleótido u oligonucleótido complementarias a secuencias de ácido nucleico derivadas de microorganismos patógenos.

El término “reactivo de captura” se refiere a un reactivo que se ha inmovilizado sobre una membrana para que se una a cualquiera de las sustancias anteriores que van a detectarse. Tal reactivo se usa para capturar la sustancia que va a detectarse. Si la sustancia que va a detectarse es un antígeno, puede usarse un anticuerpo contra el antígeno como reactivo de captura. Si la sustancia que va a detectarse es un anticuerpo, puede usarse un antígeno al que se une el anticuerpo como reactivo de captura. Además, cuando se usan sustancias entre las que existe una relación de ligando-receptor, cualquiera de los mismos puede ser la sustancia que va a detectarse mientras que la otra puede ser el reactivo de captura. Además, si la sustancia que va a detectarse es un ácido nucleico, puede usarse un ácido nucleico, que tiene una secuencia complementaria a la secuencia del ácido nucleico y por tanto puede hibridarse con el ácido nucleico, como reactivo de captura.

Según la presente invención, el término “reactivo marcado” se refiere a un conjugado obtenido permitiendo que una sustancia de marcaje adecuada se una a una sustancia capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse. Si la sustancia que va a detectarse es un antígeno, puede usarse un anticuerpo contra el antígeno como sustancia capaz de unirse específicamente a la sustancia que va a detectarse. Si la sustancia que va a detectarse es un anticuerpo, puede usarse un antígeno al que se une el anticuerpo como sustancia capaz de unirse específicamente a la sustancia que va a detectarse. Cuando se usan sustancias entre las que existe una relación de ligando-receptor, cualquiera de los mismos puede ser la sustancia que va a detectarse mientras que la otra puede ser la sustancia capaz de unirse específicamente a la sustancia que va a detectarse. Además, si la sustancia que va a detectarse es un ácido nucleico, puede usarse un ácido nucleico, que tiene una secuencia complementaria a la secuencia del ácido nucleico y por tanto puede hibridarse con el ácido nucleico, como sustancia capaz de unirse específicamente a la sustancia que va a detectarse. Puede usarse cualquier sustancia de marcaje generalmente usada para el marcaje de una sustancia. Los ejemplos de las mismas incluyen: partículas coloidales metálicas tales como partículas coloidales de oro; partículas coloidales no metálicas tales como partículas coloidales de selenio; partículas de una sustancia de resina tales como partículas de látex coloreadas; partículas insolubles tales como partículas coloidales de colorante y liposomas coloreados; enzimas que catalizan reacciones cromogénicas tales como fosfatasa alcalina y peroxidasa; fluorocromos; y radioisótopos. La sustancia de marcaje usada en la presente invención puede ser un producto comercial generalmente disponible.

Una característica importante del dispositivo de detección de la presente invención es el uso de una sustancia catiónica en una sección de presentación visual de referencia. La sección de presentación visual de referencia puede proporcionarse inmovilizando una sustancia catiónica sobre un portador de membrana. En este caso, la inmovilización de una sustancia catiónica sobre un portador de membrana puede llevarse a cabo permitiendo que el portador de membrana absorba una sustancia catiónica y luego se seque. Se supone que la sustancia catiónica retiene una carga positiva fuerte de modo que provoca que un anfolito tal como una proteína que se introduce en las cercanías de la misma esté cargada negativamente, tras lo cual captura la proteína por medio de una interacción eléctrica entre la carga negativa y la carga positiva de la propia sustancia catiónica. Esto es probablemente porque

el pH en las proximidades de una sustancia catiónica fuerte es siempre básico, lo que finalmente provoca que un anfolito tal como una proteína que se introduce en las cercanías de una sustancia catiónica esté cargada negativamente. La sustancia catiónica usada en la presente invención es fuertemente catiónica hasta un grado tal que puede provocar que un anfolito que se introduce en las cercanías de la misma esté cargado negativamente. A diferencia de la unión de un reactivo marcado provocada por una reacción de antígeno-anticuerpo convencional, una sustancia catiónica no tiene selectividad (es decir, especificidad) en cuanto al sujeto de unión. Una sustancia catiónica puede adsorberse a cualquier sustancia aniónica o cualquier anfolito que esté cargado negativamente en condiciones básicas. Es decir, para el dispositivo de la presente invención en el que se usa una sustancia catiónica para una sección de presentación visual de referencia, una sustancia capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse, que se permite que se una a una sustancia de marcaje, es una sustancia aniónica o un anfolito que está cargado negativamente en condiciones básicas. Un ejemplo de la misma es una proteína tal como un anticuerpo. Sin embargo, existe el problema de que la unión de un reactivo marcado podría inhibirse por la unión de una sustancia foránea en una muestra. Tal problema puede resolverse fácilmente aplicando una cantidad suficiente de una sustancia catiónica. Ésta es una característica muy importante de la presente invención. En general, la aplicación de una cantidad excesiva de un antígeno, un anticuerpo, o similar a un portador de membrana tiende a afectar al rendimiento en cuanto al volumen de unión o la tasa de unión. Por tanto, la cantidad de anticuerpo que va a aplicarse no puede aumentarse significativamente. Esto es probablemente porque el epítipo o sitio de reconocimiento de epítopos de una molécula de antígeno o anticuerpo está enmascarado por una molécula de antígeno o anticuerpo diferente. La presente invención usa interacción eléctrica y por tanto el volumen de unión puede controlarse simplemente aumentando o disminuyendo la cantidad de la sustancia catiónica que va a inmovilizarse. En la presente invención se usa polialilamina como sustancia catiónica que va a aplicarse a una sección de presentación visual de referencia. Por ejemplo, el polímero catiónico que va a usarse es un compuesto de polímero que tiene grupos amino o grupos en la cadena principal o cadena lateral, una densidad de carga catiónica de 0,4 meq/g a 21 meq/g (preferiblemente de 1,0 meq/g a 21 meq/g y más preferiblemente de 4,0 meq/g a 21 meq/g), y un peso molecular promedio de 300 a 5.000.000. Los ejemplos de tal polímero catiónico descrito en el presente documento incluyen polietilenimina y polivinilamina. La polietilenimina incluye PEI lineal y polietilenimina ramificada que comprende amina primaria, secundaria o terciaria, y puede usarse cualquiera de ellas. Además, el peso molecular de la polietilenimina no está limitado. Además, puede incluirse polietilenimina sometida a modificación química tal como desacetilación. Además, los ejemplos de polialilamina incluyen derivados de polialilamina tales como poli(alil-N-carbamoilguanidino-co-alilamina). Los ejemplos de tensioactivo catiónico descritos en el presente documento incluyen cloruro de benzalconio y bromuro de tetradeciltrimetilamonio. Puede usarse una mezcla de las sustancias anteriores. La polialilamina es deseable en cuanto a coste, facilidad de producción y reactividad rápida y nítida. La cantidad de la sustancia catiónica anterior que va a inmovilizarse no está limitada. Sin embargo, la sustancia se prepara a una concentración del 0,1% al 10% (p/v). Luego, se añaden de 0,1 µl a 10 µl de la sustancia a una membrana de un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal o de tipo de flujo lateral, seguido por fijación. En un método alternativo, puede conferirse una función de presentación visual de referencia a tal dispositivo de prueba situando una membrana de nailon cargada positivamente por medio de modificación química sobre una parte de una membrana de un dispositivo de prueba de manera que se solapen entre sí.

A continuación, se describen realizaciones específicas del dispositivo de prueba de la presente invención.

El dispositivo de prueba de la presente invención es un dispositivo de tipo de flujo lateral.

En la figura 1 se muestra un ejemplo específico de la configuración de un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral. El dispositivo de prueba mostrado en la figura 1 es meramente un ejemplo y por tanto el dispositivo de prueba de la presente invención no está limitado a la configuración mostrada en la figura 1 en cuanto a estructura o tamaño. En la figura 1, las referencias numéricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 indican una lámina de soporte, un portador de membrana, un elemento impregnado, un elemento de suministro de muestra, un elemento de absorción de agua, una sección de presentación visual de detección y una sección de presentación visual de referencia, respectivamente. La lámina de soporte es una lámina hecha de plástico o similar y se usa para mantener la estructura del dispositivo de prueba. El portador 2 de membrana está compuesto por una membrana de nitrocelulosa con una anchura de 5 mm y una longitud de 30 mm en forma de banda. El reactivo de captura se inmoviliza en un sitio 7,5 mm alejado del extremo del portador 2 de membrana en el lado en el que comienza el desarrollo cromatográfico (el extremo izquierdo del portador 2 de membrana en la figura 1) de manera que se forma una sección 6 de presentación visual de detección. Puede usarse un método conocido que implica adsorción física, unión química, o similar como método para fijar un reactivo de captura sobre un portador 2 de membrana. El reactivo de captura se inmoviliza en una forma lineal sobre el portador 2 de membrana de manera que se forma la sección 6 de presentación visual de detección. Sin embargo, puede inmovilizarse de cualquier forma, tal como una forma circular o cuadrada. Se inmoviliza una sustancia catiónica en un sitio 4,0 mm alejado de la sección 6 de presentación visual de detección sobre el portador 2 de membrana de manera que se forma una sección 7 de presentación visual de referencia. Como en el caso de la sección 6 de presentación visual de detección, puede usarse un método conocido que implica adsorción física, unión química, o similar como método para fijar una sustancia catiónica sobre el portador 2 de membrana para la sección 7 de presentación visual de referencia. La sustancia catiónica se inmoviliza en una forma lineal sobre el portador 2 de membrana de manera que se forma la sección 7 de presentación visual de referencia. Sin embargo, puede inmovilizarse de cualquier forma, tal como una forma circular

o cuadrada. Tal como se muestra en el ejemplo de la figura 1, se forma deseablemente una sección de presentación visual de referencia aguas abajo de una sección de presentación visual de detección sobre la que se ha inmovilizado un reactivo de captura. En el dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral de la presente invención, el flujo de una disolución comienza desde el elemento de suministro de muestra y se desplaza hacia el elemento de absorción de agua. En este caso, los términos “aguas arriba” y “aguas abajo” se definen basándose en la dirección de tal flujo. Se describe una membrana de nitrocelulosa como ejemplo del portador 2 de membrana. Sin embargo, puede usarse cualquier membrana siempre que permita el desarrollo cromatográfico de un analito contenido en una muestra de prueba, y el reactivo de captura y la sustancia catiónica descripta anteriormente puedan inmovilizarse sobre la misma. Los ejemplos de una membrana que pueden usarse incluyen otras membranas de celulosa, membranas de nailon y membranas de fibra de vidrio. El elemento 3 impregnado consiste en un elemento impregnado con un reactivo marcado. Se usa material textil no tejido que comprende fibras sintéticas en forma de banda con un tamaño de 5 mm x 8 mm para el elemento 3 impregnado. Sin embargo, la presente invención no está limitada a lo mismo. Por ejemplo, también puede usarse material textil de celulosa (papel de filtro, membrana de nitrocelulosa, o similar) y material textil de plástico poroso que comprende fibras de vidrio, polietileno, polipropileno, o similar. El reactivo marcado se marca con una sustancia de marcaje y se une específicamente a la sustancia que va a detectarse. Los ejemplos de la sustancia de marcaje incluyen, pero no se limitan a, una sustancia de marcaje de color, una sustancia de marcaje de enzima y una sustancia de marcaje fluorescente. De éstas, se usa preferiblemente una sustancia de marcaje de color en cuanto a determinación rápida y conveniente por medio de observación visual de cambios de color en la sección 6 de presentación visual de detección. Los ejemplos de una sustancia de marcaje de color incluyen látex tal como látex sintético (por ejemplo, látex de poliestireno) o látex de caucho natural teñido con un colorante tal como un colorante rojo o azul, además de un coloide metálico tal como coloide de oro o coloide de platino. De estos, el látex de poliestireno es particularmente preferible. El elemento 3 impregnado puede producirse impregnando un elemento que consiste en el material textil no tejido anterior que comprende fibras sintéticas o similares con una suspensión de un reactivo marcado y secando el elemento impregnado. Tal como se muestra en la figura 1, el portador 2 de membrana se une en el medio de la lámina 1 de soporte. La parte de extremo aguas abajo del elemento 3 impregnado está situada sobre o bajo la parte de extremo del portador 2 de membrana en el lado sobre el que comienza el desarrollo cromatográfico (a continuación en el presente documento denominado “lado aguas arriba” (es decir, el lado izquierdo en la figura 1), mientras que el lado opuesto del mismo se denomina “lado aguas abajo” (es decir, el lado derecho en la figura 1)) de manera que el elemento 3 impregnado se conecta secuencialmente al portador 2 de membrana. Entonces, la parte aguas arriba del elemento 3 impregnado se une a la lámina 1 de soporte. Por tanto, puede producirse el dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral de la presente invención. El dispositivo en forma de tira mostrado en la figura 1 puede denominarse “tira cromatográfica”. Cuando la sustancia que va a detectarse se captura usando una reacción de antígeno-anticuerpo, el dispositivo se denomina algunas veces “dispositivo inmunocromatográfico” o “tira inmunocromatográfica”.

Además, si es necesario, también es posible situar la parte aguas abajo de un elemento 4 de suministro de muestra sobre la superficie superior del elemento 3 impregnado de manera que se solapen entre sí y unan la parte aguas arriba del elemento 4 de suministro de muestra a la lámina 1 de soporte. También es posible situar la parte aguas arriba de un elemento 5 de absorción de agua sobre la superficie superior de la parte aguas abajo del portador 2 de membrana de manera que se solapen entre sí y unan la parte aguas abajo del elemento 5 de absorción de agua a la lámina 1 de soporte. Los ejemplos de un elemento 4 de suministro de muestra que pueden usarse incluyen: material textil no tejido que consiste en fibras sintéticas porosas de polietileno poroso, polipropileno poroso, o similar; papel de celulosa tal como papel de filtro y material textil de algodón; material textil tejido; y material textil no tejido.

El elemento 5 de absorción de agua es el elemento al que llega el flujo de la muestra líquida suministrada al elemento 4 de suministro de muestra. El elemento de suministro de muestra absorbe y retiene una muestra fluida de manera que la muestra de analito fluye rápidamente de aguas arriba a aguas abajo. Por tanto, el elemento 5 de absorción de agua puede consistir en un material que absorbe rápidamente y retiene líquido. Los ejemplos de tal material incluyen celulosa, fibras de vidrio y material textil no tejido que consiste en plástico poroso tal como polietileno o polipropileno. En particular, la celulosa es el material más adecuado. Además, puede proporcionarse un dispositivo inmunocromatográfico de tipo de flujo lateral mostrado en la figura 1 con una configuración en la que se une una lámina laminada a la superficie del portador 2 de membrana para su protección o en el que se hacen una abertura de una entrada de muestra de prueba y una abertura de una ventana de determinación sobre una carcasa de plástico adecuada para un elemento 4 de suministro de muestra, una sección 6 de presentación visual de detección y una sección 7 de presentación visual de referencia incorporados dentro de la carcasa.

Cuando se suministra una muestra líquida a un elemento 4 de suministro de muestra, la muestra líquida permea el elemento 4 de suministro de muestra y se transfiere a un elemento 3 impregnado mediante acción capilar, y entonces la muestra líquida disuelve un reactivo marcado contenido en el elemento 3 impregnado. Si la sustancia que va a detectarse está presente en la muestra líquida, la sustancia se une al reactivo marcado de manera que se forma un complejo de “reactivo marcado-sustancia que va a detectarse”. Tal complejo de “reactivo marcado-sustancia que va a detectarse” permea adicionalmente mediante acción capilar y se transfiere al portador 2 de membrana de modo que pasa a través de la sección 6 de presentación visual de detección. En tal momento, el reactivo de captura en la sección 6 de presentación visual de detección captura el complejo de “reactivo marcado-sustancia que va a detectarse” de manera que se forma un complejo de intercalación de “reactivo marcado-sustancia que va a detectarse-reactivo de captura”. Además, una parte del reactivo marcado que no reacciona con la

sustancia que va a detectarse no se captura en la sección 6 de presentación visual de detección y se transfiere adicionalmente a la sección 7 de presentación visual de referencia ubicada aguas abajo del portador 2 de membrana. La parte del reactivo marcado transferida a la sección 7 de presentación visual de referencia se captura por la sustancia catiónica inmovilizada sobre la sección 7 de presentación visual de referencia. En tal caso, una parte de una sustancia aniónica una muestra líquida podría haberse unido a la sustancia catiónica sobre la sección 7 de presentación visual de referencia. Sin embargo, es improbable que esto influya en la captura del reactivo marcado. Entonces, se detectan una parte del reactivo marcado capturado por la sección 6 de presentación visual de detección y la capturada por la sección 7 de presentación visual de referencia. Puede seleccionarse el método más apropiado para detectar un reactivo marcado dependiendo del método de marcaje relevante. Por ejemplo, en el caso de marcaje con una enzima, se suministra un sustrato para el desarrollo de color. En el caso de marcaje con una sustancia fluorescente o radioisótopo, se usa un dispositivo especializado para la determinación. En el caso de marcaje con partículas coloreadas tales como partículas coloidales de oro o partículas de látex, se confirma una imagen de agregación mediante observación visual. Cuando el marcador del reactivo marcado se detecta en la sección 7 de presentación visual de referencia, esto indica que la muestra líquida suministrada al elemento 4 de suministro de muestra ha pasado a través de la sección 6 de presentación visual de detección y ha llegado a la sección 7 de presentación visual de referencia. Por consiguiente, puede determinarse que el ensayo se ha llevado a cabo de manera normal. Si la sustancia que va a detectarse está presente en la muestra líquida, se detecta el marcaje del reactivo marcado en la sección 6 de presentación visual de detección y en la sección 7 de presentación visual de referencia. Si la sustancia que va a detectarse no está presente en la muestra líquida, se detecta el marcador del reactivo marcado sólo en la sección 7 de presentación visual de referencia.

Además, en otra realización de un dispositivo de tipo de flujo lateral, existe un método en el que el elemento 4 de suministro de muestra está situado directamente sobre el portador de membrana de manera que se solapan entre sí sin el elemento 3 impregnado entre medias, se mezclan de antemano la muestra líquida y el reactivo marcado, y se suministra la mezcla al elemento 4 de suministro de muestra. Cuando la muestra líquida y el reactivo marcado se mezclan de antemano, la sustancia que va a detectarse en la muestra líquida forma un complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse". A continuación, la mezcla de una muestra líquida y un reactivo marcado se suministra al elemento 4 de suministro de muestra. Por consiguiente, la mezcla de la muestra líquida y el reactivo marcado permea el elemento 4 de suministro de muestra y se transfiere al portador de membrana mediante acción capilar. La mezcla de la muestra líquida y el reactivo marcado transferida al portador de membrana pasa a través de la sección 6 de presentación visual de detección. En tal momento, se captura un "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse" en la mezcla de la muestra líquida y el reactivo marcado mediante un reactivo de captura en la sección 6 de presentación visual de detección de manera que se forma un complejo de intercalación de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse-reactivo de captura". Además, una parte del complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse" que no se ha capturado mediante el reactivo de captura y una parte sin reaccionar del reactivo marcado se transfieren adicionalmente a la sección 7 de presentación visual de referencia ubicada aguas abajo de la sección 6 de presentación visual de detección y se capturan en la sección 7 de presentación visual de referencia.

Para un dispositivo de tipo de flujo transversal, se describe la configuración mostrada en la figura 2 como ejemplo. En la figura 2, las referencias numéricas 8, 9, 10, 11 y 12 indican una placa Petri de plástico de 35 mm, un lecho absorbente de agua, un portador de membrana, una sección de presentación visual de detección y una sección de presentación visual de referencia, respectivamente. Se usa una membrana de nitrocelulosa (diámetro de poro: 3 μm , Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) cortada en un trozo con un tamaño de 20 mm x 20 mm para el portador 10 de membrana permeable a los líquidos. Se proporciona una sección 11 de presentación visual de detección de analito sobre la que se ha inmovilizado un reactivo de captura sobre el portador 10 de membrana. Puede usarse un método conocido que implica adsorción física, unión química, o similar como método para fijar un reactivo de captura sobre el portador 10 de membrana. Se inmoviliza un reactivo de captura sobre el portador 10 de membrana en una forma circular de manera que se forma la sección 11 de presentación visual de detección. Sin embargo, puede inmovilizarse de cualquier forma, tal como una forma lineal o cuadrada. Se proporciona una sección 12 de presentación visual de referencia sobre la que se ha inmovilizado una sustancia catiónica al portador 10 de membrana de una manera tal que la sección 12 de presentación visual de referencia y la sección 11 de presentación visual de detección existen en el mismo plano con una determinada distancia entre medias. Como en el caso de la sección 11 de presentación visual de detección, puede usarse un método conocido que implica adsorción física, unión química, o similar como método para fijar la sección 12 de presentación visual de referencia sobre el portador 10 de membrana. Se inmoviliza una sustancia catiónica sobre el portador 10 de membrana en una forma circular de manera que se forma la sección 12 de presentación visual de referencia. Sin embargo, puede inmovilizarse de cualquier forma, tal como una forma lineal o cuadrada. Se usa una membrana de nitrocelulosa para el portador 10 de membrana. Sin embargo, puede usarse cualquier membrana siempre que permita el desarrollo cromatográfico de un analito contenido en una muestra de prueba, y el reactivo de captura y la sustancia catiónica descritos anteriormente puedan inmovilizarse sobre la misma. Los ejemplos de una membrana que pueden usarse incluyen otras membranas de celulosa y membranas que comprende material textil no tejido, fibras de algodón, fibras de plástico tales como fibras de nailon o uretano, o fibras mixtas de las mismas. Se coloca el lecho 9 absorbente de agua con un tamaño adecuado (mayor que la membrana de nitrocelulosa con un tamaño de 20 mm x 20 mm) en la placa 8 Petri de plástico. Además, se coloca el portador 10 de membrana sobre el lecho 9 absorbente de agua de manera que puede observarse la cara sobre la que se ha añadido el reactivo gota a gota y se ha inmovilizado (superficie superior). Se añade una muestra líquida a la superficie superior del portador 10 de membrana. La superficie superior

del portador 10 de membrana de denomina cara de instilación de la muestra. El lecho 9 absorbente de agua es el elemento al que llega la muestra líquida fluida suministrada. Se usa como medio de absorción de agua para absorber y retener una muestra fluida. Para un medio de absorción de agua en contacto con la superficie inferior del portador de membrana, pueden formarse fibras obtenidas a partir de papel de filtro o algodón absorbente para dar un lecho absorbente de agua y usarse tal como se muestra en el ejemplo de la figura 2. Sin embargo, puede usarse cualquier medio, tal como un fármaco que comprende un polímero de absorción de agua o un aspirador de vacío, siempre que absorba o aspire el líquido que pasa a través del portador de membrana. Además, en el ejemplo mostrado en la figura 2, se usa una placa Petri de plástico. Sin embargo, la configuración del dispositivo de prueba no está limitada a una placa Petri de plástico. Puede emplearse cualquier configuración siempre que pueda retener un portador de membrana y un medio de absorción de agua, por ejemplo, incorporándolos dentro de un dispositivo de plástico.

Cuando se suministra una muestra líquida a la superficie superior (cara de instilación de la muestra) de un portador 10 de membrana, la muestra líquida pasa a través de la membrana y se absorbe mediante el lecho 9 absorbente de agua. En tal momento, si la sustancia que va a detectarse está presente en la muestra líquida, la sustancia que va a detectarse se captura mediante el reactivo de captura en la sección 11 de presentación visual de detección de manera que se forma un complejo de "sustancia que va a detectarse-reactivo de captura". A continuación, se suministra una sustancia capaz de unirse específicamente a una sustancia que va a detectarse que está marcada con una enzima tal como peroxidasa, una sustancia fluorescente, un radioisótopo, partículas colorantes tales como partículas coloidales de oro o partículas de látex, o similares (reactivo marcado) a la cara de instilación de reactivo del portador 10 de membrana de manera que se permite que se una a la sustancia que va a detectarse que se ha capturado mediante la sección 11 de presentación visual de detección. Por tanto, se forma un complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse-reactivo de captura". Además, se captura una parte del reactivo marcado mediante una sustancia catiónica inmovilizada en la sección 12 de presentación visual de referencia. En tal caso, una parte de una sustancia aniónica en una muestra líquida podría haberse unido a la sustancia catiónica en la sección 12 de presentación visual de referencia. Sin embargo, es improbable que esto influya en la captura del reactivo marcado. Entonces, se detectan la parte del reactivo marcado capturado por la sección 11 de presentación visual de detección y la capturada por la sección 12 de presentación visual de referencia. Puede seleccionarse el método más apropiado para detectar un reactivo marcado dependiendo del método de marcaje relevante. Por ejemplo, en el caso de marcaje con una enzima, se suministra un sustrato para el desarrollo de color. En el caso de marcaje con una sustancia fluorescente o radioisótopo, se usa un dispositivo especializado para la determinación. En el caso de marcaje con partículas coloreadas tales como partículas coloidales de oro o partículas de látex, se confirma una imagen de agregación mediante observación visual. Si la sustancia que va a detectarse está presente en la muestra líquida, se detecta el marcador del reactivo marcado en tanto la sección 11 de presentación visual de detección como la sección 12 de presentación visual de referencia. Si la sustancia que va a detectarse no está presente en la muestra líquida, se detecta el marcador del reactivo marcado sólo en la sección 12 de presentación visual de referencia.

Además, se usa otra configuración de un dispositivo de tipo de flujo transversal para un método en el que se mezclan de antemano una muestra líquida y un reactivo marcado y luego se suministra la mezcla a la cara de instilación de la muestra de un portador de membrana. Cuando la muestra líquida y el reactivo marcado se mezclan de antemano, la sustancia que va a detectarse en la muestra líquida forma un complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse". A continuación, se suministra la mezcla de una muestra líquida y un reactivo marcado a la cara de instilación de la muestra de un portador de membrana. La mezcla de la muestra líquida y el reactivo marcado pasa a través de un portador de membrana y se absorbe mediante un medio de absorción de agua. En tal momento, se captura el complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse" en la muestra líquida mediante un reactivo de captura en una sección de presentación visual de detección. Por tanto, se forma un complejo de intercalación de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse-reactivo de captura". Además, se capturan una parte del complejo de "reactivo marcado-sustancia que va a detectarse" y una parte sin reaccionar del reactivo marcado en la sección de presentación visual de referencia. Si se detecta el marcador del reactivo marcado en la sección de presentación visual de referencia, esto indica que la muestra líquida suministrada a la cara de instilación de la muestra ha pasado a través de la sección 11 de presentación visual de detección y la sección 12 de presentación visual de referencia. Por consiguiente, puede determinarse que el ensayo se ha llevado a cabo de manera normal.

La muestra líquida que va a someterse a prueba mediante el dispositivo de prueba de la presente invención puede seleccionarse de los siguientes ejemplos: especímenes de líquidos clínicos tales como orina, heces líquidas, sangre, suero, frotis del tracto respiratorio superior y fluido de aspirado; especímenes acuosos derivados del medio ambiente; alimentos líquidos tales como agua potable; y disoluciones y emulsiones obtenidas disolviendo o suspendiendo microorganismos, heces líquidas, suelo, lodo, alimentos sólidos, componentes atmosféricos, y similares en líquido, y sobrenadantes de los mismos.

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación en el presente documento en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos, aunque la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo comparativo 1: Producción de un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral

1. Producción de un reactivo marcado con látex

5 Se añadieron partículas de látex de poliestireno azul con un diámetro de partícula promedio de 0,2 μm (Ceradyne, Inc.) a una disolución de anticuerpo monoclonal anti-adenovirus (0,5 mg/ml) previamente dializada con un tampón MES 50 mM (pH 6,0) hasta una concentración final del 0,25% (p/v). Se dejó que el resultante reposara a 37°C durante 2 horas y se sometió algunas veces a agitación. A continuación, se realizó centrifugación a 5.000 x g a 4°C durante 15 minutos para eliminar el sobrenadante. Se añadió un tampón Tris (pH 7,5) complementado con BSA al 0,5% (p/v) a partículas de látex precipitadas de manera que se ajustó el volumen de partículas de látex al volumen inicial. Se dispersaron las partículas de látex de nuevo y se dejaron reposar a 4°C durante 16 horas. Se realizó centrifugación de nuevo a 5.000 x g a 4°C durante 15 minutos para eliminar el sobrenadante. Se dispersaron partículas de látex precipitadas en un tampón Tris (pH 7,5) hasta una concentración final del 0,1% (p/v). Por tanto, se obtuvo un reactivo marcado con látex.

2. Producción de un elemento impregnado con reactivo marcado con látex

20 Se cortó papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman) en un trozo con un tamaño de 5 mm x 10 mm. Se añadió gota a gota al mismo el reactivo marcado con látex (5 μl) producido en 1 anteriormente, seguido por secado a 37°C durante 3 horas. Por tanto, se obtuvo un elemento 3 impregnado.

3. Montaje de un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral

25 Se usó un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral que tenía una configuración similar a la configuración mostrada en la figura 1.

30 Como portador 2 de membrana, se usó una lámina de membrana de nitrocelulosa (Millipore) con un tamaño de 5 mm (anchura) x 30 mm (longitud). Se usó un dispositivo de pulverización de presión positiva (BioJet; BioDot) para aplicar una disolución de anticuerpo monoclonal anti-adenovirus derivado de línea celular de hibridoma (5,0 mg/ml) (que difiere de la disolución descrita en 1 anteriormente) que sirve como reactivo de captura al portador de manera que se formó una línea 6 mm alejada del extremo del eje largo del portador (designado extremo aguas arriba, mientras que el extremo opuesto del mismo se designó extremo aguas abajo). Además, se aplicó polietilenoimina P-70 al 1% (p/v) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que sirve como reactivo de referencia al portador de manera que se formó una línea 4 mm alejada de la línea formada anteriormente en el lado aguas abajo. Después de eso, se secó el portador en condiciones de 37°C durante 3 horas. Por tanto, se formaron una sección 6 de presentación visual de detección y una sección 7 de presentación visual de referencia.

40 A continuación, se unió el portador 2 de membrana a la lámina 1 de soporte de plástico (BioDot) cortada para que tuviese una anchura de 5 mm de una manera tal que se unió a la misma la cara opuesta a la cara a la que se habían aplicado los reactivos. (En tal caso, es necesario que la lámina 1 de soporte tenga una longitud excedente adecuada porque es necesario fijar por separado el elemento 3 impregnado anterior y el elemento 5 de absorción de agua mencionado a continuación en ambos extremos del portador 2 de membrana). Posteriormente, se unió el elemento 3 impregnado a la lámina 1 de soporte en el lado aguas arriba del portador 2 de membrana de una manera tal que el elemento 3 impregnado y el portador 2 de membrana se solapaban entre sí 1 mm. Entonces, se unió un trozo de papel de filtro (Advantec Toyo Kaisha Ltd.) con un tamaño de 5 mm x 10 mm que sirve como elemento 4 de suministro de muestra a la lámina de soporte de una manera tal que el elemento 4 de suministro de muestra y el elemento 3 impregnado se solapaban entre sí 9 mm. Además, se unió papel de filtro grueso (Whatman) con un tamaño de 5 mm x 30 mm que sirve como elemento 5 de absorción de agua a la lámina 1 de soporte en el lado aguas abajo del portador 2 de membrana de una manera tal que el elemento 5 de absorción de agua y el portador de membrana se solapaban entre sí 10 mm. Al final, se cortaron las partes innecesarias de la lámina de soporte que sobresalían hacia fuera desde ambos extremos. Por tanto, se obtuvo el dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral mostrado en la figura 1.

4. Detección de antígenos

55 Se usó un tampón Tris 50 mM (pH 8,0) que contenía Triton X-100 al 1% (p/v) y clorhidrato de arginina al 2% (p/v) como revelador, y se realizó un experimento modelo usando un antígeno CF de adenovirus (Denka Seiken Co., Ltd.) como analito. Se diluyó adecuadamente el antígeno CF de adenovirus con un revelador usado como disolvente de dilución. Por tanto, se preparó una muestra líquida. Se añadió la muestra líquida (100 μl) a un tubo de ensayo pequeño. Se insertó el dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral producido en 3 anteriormente en el tubo de ensayo de manera que se situó el elemento 4 de suministro de muestra (en el lado aguas arriba) hacia abajo. Se colocó el tubo de ensayo verticalmente en una rejilla y se permitió que reposara a temperatura ambiente. Además, para el control negativo, se realizó un experimento similar con el revelador solo (100 μl). En primer lugar, se permitió que la muestra líquida penetrara en el elemento 4 de suministro de muestra. Entonces, se mezcló con un anticuerpo marcado con látex contenido en el elemento 3 impregnado y la mezcla permeó el portador 2 de membrana mediante

acción capilar. Se permitió que la mezcla de la muestra líquida y el anticuerpo marcado con látex que había permeado pasara a través de la sección 6 de presentación visual de detección y la sección 7 de presentación visual de referencia en tal orden y finalmente se absorbió mediante el elemento 5 de absorción de agua situado el más próximo al extremo aguas abajo. Por tanto, se completó el procedimiento de reacción. Tras un transcurso de tiempo suficiente para la formación de la señal de línea (20 minutos en este ejemplo), se observaron la presencia o ausencia de una línea azul que aparece en la sección 6 de presentación visual de detección y en la sección 7 de presentación visual de referencia sobre la membrana de nitrocelulosa y características de la línea tales como anchura y tono de color.

Como resultado, se observaron líneas azules claras en la sección 6 de presentación visual de detección y en la sección 7 de presentación visual de referencia del dispositivo de prueba en el que había permeado la muestra líquida, respectivamente. Fue posible confirmar señales positivas en la sección 6 de presentación visual de detección con el uso de una disolución que contenía el antígeno CF de adenovirus anterior diluido hasta 1.000 veces. Mientras tanto, en el caso del dispositivo de prueba en el que había permeado el revelador solo (usado como control negativo), se observó una línea azul nítida en la sección 7 de presentación visual de referencia, mientras que, por otro lado, no se presentó visualmente ninguna línea en la sección 6 de presentación visual de detección. Por consiguiente, se confirmó que una sección de presentación visual de referencia formada permitiendo que un portador de membrana absorba una sustancia catiónica y secando el portador también puede presentar visualmente una línea intensamente coloreada y por tanto función suficiente como sección de presentación visual de referencia.

En este caso, el dispositivo de prueba usado en el ejemplo 1 es una tira inmunocromatográfica que usa una reacción de antígeno-anticuerpo. Tal tira inmunocromatográfica puede incorporarse dentro de una carcasa de plástico y el producto resultante puede usarse como dispositivo inmunocromatográfico.

Ejemplo comparativo 2: Producción de un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal

1. Producción de un anticuerpo marcado con coloide de oro

Se añadió gota a gota un anticuerpo monoclonal frente a virus influenza NP anti-tipo A o anti-tipo B (100 µg/ml) (1 volumen) previamente dializado con una disolución acuosa de borato de sodio 2 mM a una disolución de coloide de oro (BBI; tamaño de partícula: 40 nm; concentración de ácido cloroáurico: 0,01% (p/v)) (9 volúmenes) ajustada a pH 5,5 con una disolución acuosa de carbonato de potasio (concentración final: 10 µg/ml), seguido por agitación lenta durante 5 minutos. Después de eso, se añadió a lo mismo disolución de BSA al 10% (p/v) (1 volumen), seguido por agitación adicional durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó el volumen total del resultante a 14.000 rpm a 4°C durante 30 minutos para eliminar el sobrenadante. Se añadieron BSA al 1% (p/v) y un tampón Tris 10 mM (pH 8,5) complementado con cloruro de sodio 150 mM a partículas coloidales de oro precipitadas para su redispersión. Se diluyó la dispersión de manera que la absorbancia a 530 nm se hizo de 2,0. Al final, se mezclaron entre sí cantidades iguales de un anticuerpo anti-tipo A marcado con coloide de oro y un anticuerpo anti-tipo B marcado con coloide de oro producidos de la manera descrita anteriormente de manera que se obtuvo un anticuerpo anti-influenza.

2. Aplicación de un reactivo a una membrana de nitrocelulosa

Se usó un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal que tenía una configuración similar a la configuración mostrada en la figura 3.

Se cortó una membrana de nitrocelulosa (diámetro de poro: 3 µm; Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) en un trozo con un tamaño de 20 mm x 20 mm. Se usó el trozo como portador 10 de membrana permeable a los líquidos. Suponiendo que se dibujó un cuadrado con un tamaño de 10 mm x 10 mm en el centro de una membrana de nitrocelulosa de este tipo, se indicaron los puntos que corresponderían a las cuatro esquinas de un cuadrado de este tipo mediante "a", "b", "c" y "d" en el sentido de las agujas del reloj partiendo de una esquina arbitraria.

Los anticuerpos monoclonales frente a virus influenza NP anti-tipo A y anti-tipo B, cada uno de los cuales se había obtenido de una línea celular de hibridoma distinta de la del anticuerpo descrito en 1 anteriormente, se dializaron por separado de antemano con un tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) para ajustar la concentración a 3 mg/ml.

Se añadieron gota a gota un anticuerpo monoclonal frente a virus influenza NP anti-tipo A y un anticuerpo monoclonal frente a virus influenza NP anti-tipo B en una cantidad de 1 µl a los puntos "a" y "b" sobre la membrana de nitrocelulosa, respectivamente. Por tanto, se formaron una sección de presentación visual de detección de tipo A "a" y una sección de presentación visual de detección de tipo B "b". Posteriormente, se añadió gota a gota polietiliminina P-70 al 1% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (1 µl) al punto "c" de manera que se formó una sección de presentación visual de referencia "c". No se añadió anticuerpo al punto "d" restante, y el punto "d" se designó como blanco y se usó como marca para distinguir las ubicaciones de los puntos "a", "b" y "c" tras la finalización de la prueba. (Alternativamente, es posible realizar una marca pequeña en el punto "d" con un lápiz o similar).

Se secó la membrana de nitrocelulosa sobre la que se habían añadido los reactivos gota a gota a 37°C durante 3 horas.

5 3. Montaje de un dispositivo de prueba de tipo de flujo transversal

10 Se colocó un lecho 9 absorbente de agua de celulosa (Vessel Inc.) con un tamaño mayor que el tamaño del portador 10 de membrana anterior (20 mm x 20 mm) en una placa 8 Petri de plástico con un diámetro de 35 mm. Además, se situó el portador 10 de membrana sobre el lecho 9 absorbente de agua de manera que pudiera observarse la cara sobre la que se había añadido el reactivo gota a gota (superficie superior). Por tanto, se obtuvo un dispositivo inmunocromatográfico de tipo de flujo transversal.

4. Detección de antígenos

15 Se usó como diluyente de analito tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) que contenía BSA al 5% (p/v), Triton X-100 al 5% (p/v) y gelatina al 2% (p/v). Se usó como analito positivo un virus influenza de tipo A o un virus influenza de tipo B, que se había diluido adecuadamente. Se usó el diluyente de analito anterior como analito negativo.

20 Se mezcló el anticuerpo anti-influenza marcado con coloide de oro obtenido en 1 anteriormente con cada analito diluido con el diluyente de analito anterior a una razón de 1:4. Se añadió cada resultante (1 ml) gota a gota sobre una membrana de nitrocelulosa del dispositivo de prueba obtenido en 3 anteriormente. Se realizó la adición gota a gota lenta y gradualmente y se dejó que el portador 10 de membrana reposara a temperatura ambiente hasta que no se observó líquido sobre el mismo. Entonces, se determinó la presencia o ausencia de manchas rojas derivadas de coloide de oro.

25 Como resultado, se detectó el virus influenza de tipo A hasta 10^5 ufp/ml en la sección de presentación visual de detección de tipo A "a", y esta sección dio resultados negativos para el virus influenza de tipo B. El virus influenza de tipo B se detectó hasta 10^5 ufp/ml en la sección de presentación visual de detección de tipo B "b", y esta sección dio resultados negativos para el virus influenza de tipo A. Mientras tanto, en el caso de la sección de presentación visual de referencia "c", se formó una mancha intensamente coloreada en cualquier caso independientemente de la concentración o el tipo de analito, y por tanto se confirmó una función suficiente de la sección como sección de presentación visual de referencia.

35 Ejemplo 3: Comparación y examen de reactivos de presentación visual de referencia

1. Producción de dispositivos de prueba de tipo de flujo lateral

40 Se produjeron dispositivos de prueba de tipo de flujo lateral usando los siguientes 7 tipos de reactivos como reactivos candidatos usados para secciones de presentación visual de referencia de la manera descrita en el ejemplo 1.

(1) anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón 3,0 mg/ml (Dako): Un método convencional

45 (2) polietilenimina P-70 al 1% (p/v) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): Una sustancia catiónica

(3) polialilamina HCl-10S al 1% (p/v) (Nitto Boseki Co., Ltd.): Una sustancia catiónica

(4) carboximetilcelulosa al 1% (p/v) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): Una sustancia aniónica

50 (5) sericina al 1% (p/v) (Toyo Boseki Kabushiki Kaisha): Una sustancia aniónica

(6) polietilenglicol al 1% (p/v) (Nacalai Tesque, Inc.): Una sustancia no iónica

55 (7) poli(alcohol vinílico) al 1% (p/v) (Nacalai Tesque, Inc.): Una sustancia no iónica

2. Método de prueba

60 Como en el ejemplo 1, se usó como revelador un tampón Tris 50 mM (pH 8,0) que contenía Triton X-100 al 1% (p/v) y clorhidrato de arginina al 2% (p/v) y se usó como analito un antígeno CF de adenovirus (Denka Seiken Co., Ltd.). Se usó un revelador como un disolvente de dilución para la dilución adecuada del antígeno CF de adenovirus. Se designó el analito diluido 100 veces como analito fuertemente positivo. Se designó el analito diluido 500 veces como analito débilmente positivo. Por tanto, se prepararon muestras líquidas. Se realizó una prueba de la manera descrita en el ejemplo 1. Se observaron la presencia o ausencia de una línea azul que aparecía en la sección 7 de presentación visual de referencia de cada dispositivo de prueba y características de la línea tales como anchura y color.

65

3. Resultados y discusión

Se examinaron los dispositivos de prueba para los que se habían usado diferentes reactivos en las respectivas secciones 7 de presentación visual de referencia basándose en comparaciones relacionadas con la formación de una línea en la sección 7 de presentación visual de referencia, la duración de la aparición de una línea de este tipo y la influencia de una línea de este tipo tras aparecer una línea en la sección 6 de presentación visual de detección (tabla 1). Como resultado de la comparación de la línea observada en el caso de un método convencional de (1) con otras líneas, particularmente en los casos de (2) y (3), la línea derivada de sustancia catiónica presentaba un tono de color más oscuro y más nítido que el observado en el caso de un método convencional de (1). Además, la duración de la aparición de la línea fue más corta que en el caso de (1). En los otros casos que implican el uso de reactivos de referencia que comprenden cada uno una sustancia aniónica o una sustancia no iónica, no se formó ninguna línea, y las secciones 7 de presentación visual de referencia relevantes no funcionaron apropiadamente. La sericina usada en (5) es una proteína que comprende residuos de aminoácido catiónicos. Sin embargo, la molécula de proteína en su totalidad está cargada negativamente. Por tanto, se cree que la sericina no funcionó como reactivo de presentación visual de referencia en el caso anterior. Además, cuando se usó cualquiera de los reactivos de presentación visual de referencia anteriores, no se confirmó la influencia sobre la línea de detección correspondiente, independientemente de la concentración de antígeno en la muestra relevante. Probablemente, esto es porque la sección 7 de presentación visual de referencia estaba ubicada aguas abajo de la sección 6 de presentación visual de detección.

[Tabla 1]

Reactivo de presentación visual de referencia	Intensidad de línea de detección (analito fuertemente positivo)	Intensidad de línea de detección (analito débilmente positivo)	Intensidad de línea de referencia	Tiempo de aparición de la línea de referencia (valor medio de 3 resultados de medición)	Características de la línea de referencia
(1)	+++	+	++	25 (s)	
(2)	+++	+	+++	20	Línea fina con tono de color oscuro
(3)	+++	+	+++	15	Línea gruesa con tono de color oscuro
(4)	+++	+	-	-	
(5)	+++	+	-	-	
(6)	+++	+	-	-	
(7)	+++	+	-	-	

-: Negativo

25 +: Débilmente positivo (detectable como positivo incluso con tono de color claro y falta de nitidez de la línea)

++: Positivo (claramente positivo)

+++ : Fuertemente positivo (claramente positivo con tono de color particularmente oscuro)

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de prueba para ensayo de membrana que usa una reacción de unión específica de una sustancia que va a detectarse con un reactivo de captura inmovilizado sobre un portador de membrana y un reactivo marcado con una sustancia de marcaje, siendo el reactivo una sustancia aniónica o un anfolito que está cargado negativamente bajo condiciones básicas, que comprende una sección de presentación visual de referencia para indicar la finalización apropiada de la prueba sobre la que se ha inmovilizado un polímero catiónico para capturar un reactivo marcado,
- 5
- 10 en el que el polímero catiónico es un compuesto de polímero que tiene una densidad de carga catiónica de 0,4 meq/g a 21 meq/g, y un peso molecular promedio de 300 a 5.000.000,
- en el que el polímero catiónico es polialilamina,
- 15 en el que el dispositivo de prueba es un dispositivo de prueba de tipo de flujo lateral,
- y en el que la sección de presentación visual de referencia para indicar la finalización apropiada de la prueba está configurada de manera que está situada aguas abajo de una sección de presentación visual de detección sobre la que se ha inmovilizado un reactivo de captura.
- 20
2. El dispositivo de prueba según la reivindicación 1, en el que la sección de presentación visual de referencia está configurada para permitir que el portador de membrana absorba el polímero catiónico y seque la membrana.
- 25
3. El dispositivo de prueba según la reivindicación 1 ó 2, en el que la reacción de unión específica es una reacción de antígeno-anticuerpo.
4. Un método para confirmar la finalización apropiada de una prueba para ensayo de membrana que usa el dispositivo de prueba según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, usando el método una reacción de unión específica de una sustancia que va a detectarse con el reactivo de captura inmovilizado sobre el portador de membrana y el reactivo marcado con la sustancia de marcaje, mediante lo cual puede confirmarse la finalización apropiada de la prueba cuando se detecta el marcaje del reactivo marcado en la sección de presentación visual de referencia sobre la membrana, permitiendo que el reactivo marcado se una al polímero catiónico inmovilizado en la sección de presentación visual de referencia.
- 30
- 35

Fig. 1

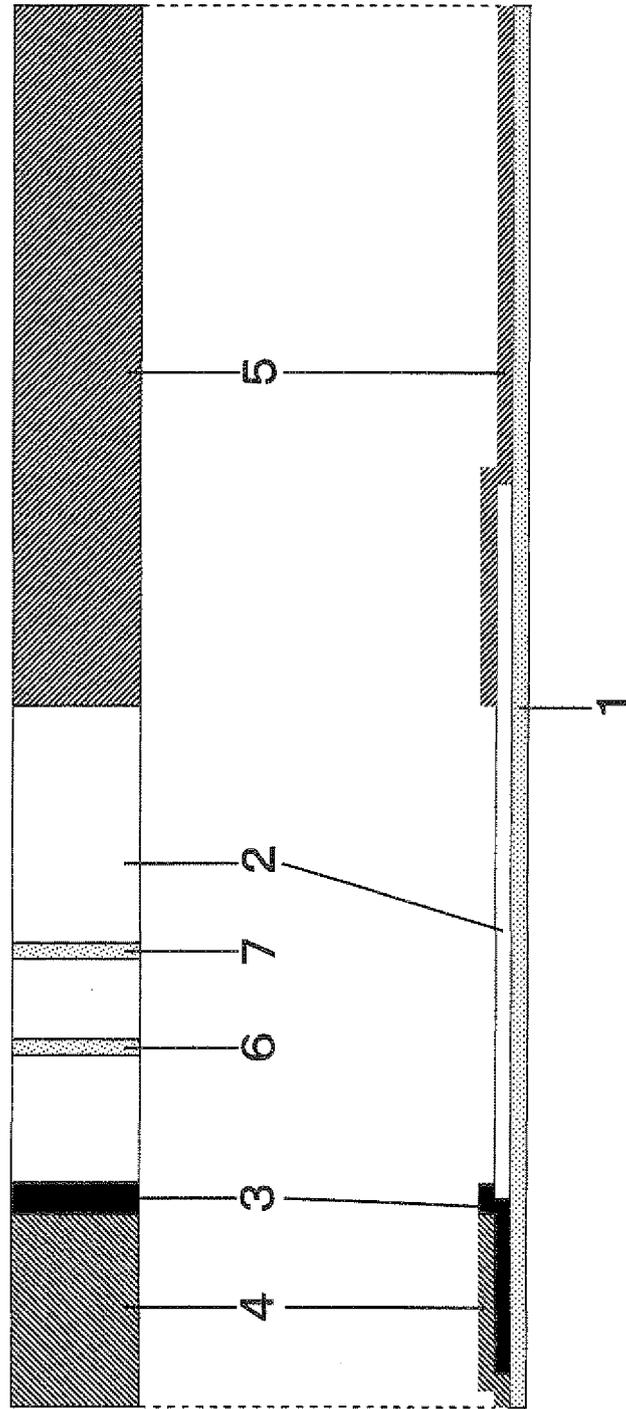


Fig.2

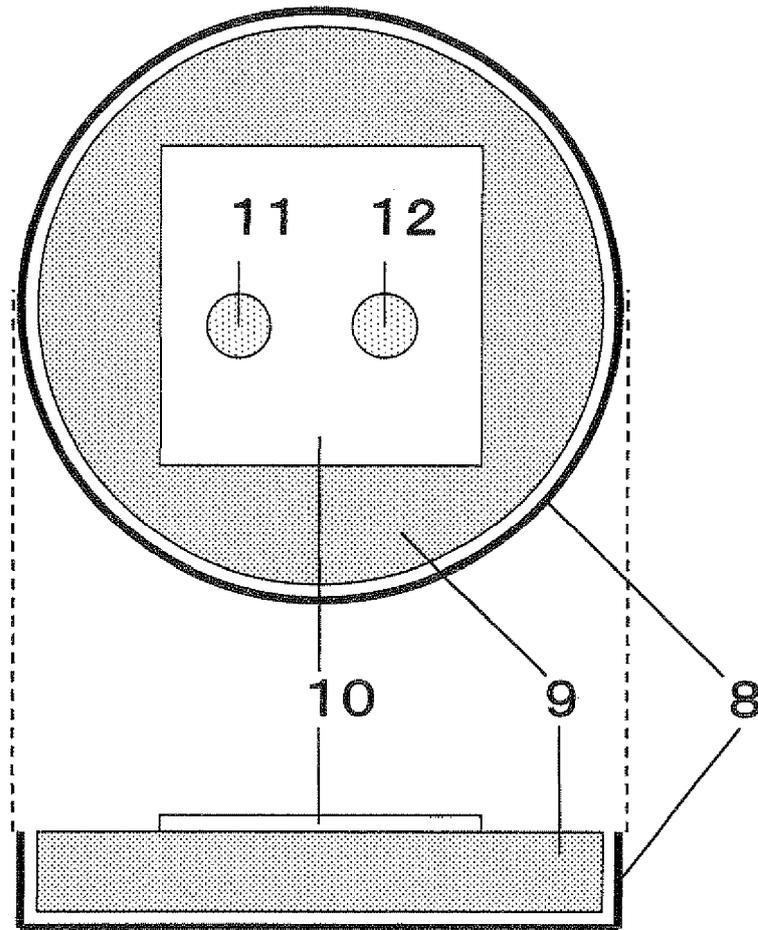


Fig.3

