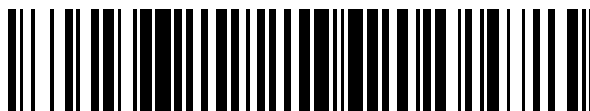


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 602**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2014** **PCT/JP2014/070206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015** **WO15016310**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2014** **E 14831189 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 3029462**

54 Título: **Una pieza de prueba inmunocromatográfica**

30 Prioridad:

02.08.2013 JP 2013161691

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

18.02.2019

73 Titular/es:

DENKA SEIKEN CO., LTD. (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome
Chuo-kuTokyo 103-8338, JP

72 Inventor/es:

KOHIYAMA RISA;
ISHIKAWA OSAMU y
MIYAZAWA TAKASHI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 700 602 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

Una pieza de prueba inmunocromatográfica

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una pieza de prueba inmunocromatográfica y la descripción también divulga un método para detectar específica y rápidamente una sustancia por detectar, en una muestra, y a un kit que utiliza la misma.

10 Técnica antecedente

La inmunocromatografía es un método inmunológico para analizar la presencia o ausencia de una sustancia por detectar, método en donde se utilizan partículas portadoras insolubles a las que se une un ligando que reconoce específicamente la sustancia por detectar, las partículas portadoras insolubles capturan la sustancia que se va a detectar, se mueven en una pieza de prueba con una estructura de fibra haciendo uso de un fenómeno capilar, y se unen a una sustancia de captura que se une específicamente a la sustancia que se va a detectar inmovilizada en una posición predeterminada en la pieza de prueba, lo que resulta en la acumulación de partículas portadoras insolubles agregadas en una posición predeterminada en la pieza de prueba, y la acumulación de las partículas portadoras insolubles agregadas se utiliza para detectar la presencia o ausencia de la acumulación de las partículas portadoras insolubles por observación visual o con un aparato de detección. La inmunocromatografía se usa ampliamente, debido a su simplicidad, para productos farmacéuticos para el diagnóstico *in vivo* de POCT (Prueba de Punto de Atención) no para laboratorio.

25 Convencionalmente, como partículas que son objeto de etiquetar un ligando que reconoce específicamente una sustancia por detectar, se han utilizado partículas portadoras insolubles como un coloide de oro, coloide de platino-oro y partículas de poliestireno coloreadas, y la presencia o ausencia de la acumulación de las partículas se ha determinado haciendo uso del tono de diversas partículas mediante observación visual o con un aparato dedicado.

30 Además, se propone mejorar la sensibilidad mediante el uso de partículas finas que emiten fluorescencia y aprovechar al máximo la simplicidad atribuible a la reacción de agregación inmunológica (consulte la Literatura de Patentes 1) para lograr una alta sensibilidad como problema.

35 Además, cuando se usan las partículas finas que emiten fluorescencia, es esencial un aparato dedicado a la detección altamente sensible de las partículas. La portabilidad del aparato es un problema extremadamente importante cuando se toma en cuenta la utilización como POCT.

40 Para resolver el problema, se propone un aparato para detectar fluorescencia, el cual es extremadamente portátil, que es económico y robusto, y que tiene una alta sensibilidad (véase la Literatura de Patentes 2).

Aunque se han realizado propuestas para un método de detección altamente sensible que usa partículas que emiten fluorescencia o un aparato de este tipo en inmunocromatografía, aún no se ha propuesto una tecnología que permita una detección altamente sensible al mejorar una pieza de prueba, y un estuche que almacena la pieza de prueba, no mejorando las partículas, en un sistema de prueba donde las partículas que son acumuladas en una posición predeterminada en la pieza de prueba y que emiten fluorescencia, son irradiadas con luz, y se detecta la luz emitida por las partículas excitadas.

Lista de citas

50 Literatura de Patentes

Literatura de patentes 1: Publicación de Patente Japonesa (Kokai) No. 2012-32263

Literatura de patentes 2: Publicación de Patente Japonesa (Kohyo) No. 2005-515429

55 Además, el documento EP 1 484 611 A2 describe un dispositivo de lectura de resultados de ensayo para leer el resultado de un ensayo utilizando un portador de transporte de líquido, que comprende al menos una fuente de luz, un fotodetector y un circuito de cálculo. El documento EP 0 291 194 A1 describe un dispositivo de prueba analítico útil, por ejemplo, en pruebas de embarazo, en particular, el uso de tiras reactivas impregnadas con reactivos en ensayos de unión específica, tales como los inmunoensayos. El documento WO 2009/144507 A1 da a conocer una aplicación de lectura de resultados de conjunto, para leer los resultados de un ensayo, que comprende un primer y un segundo umbrales de control y unos medios de procesamiento de datos para procesar una señal de medición de analito. Además, el documento WO 2011/014673 A1 describe métodos, dispositivos e instrumentos para realizar ensayos de unión a receptores. En particular, los dispositivos descritos en el documento WO 2011/014673 A1 proporcionan un proceso de humectación inicial para redissolver los reactivos de ensayo en una almohadilla conjugada antes de la movilización de esos reactivos de ensayo en un elemento de flujo lateral. La solicitud US 4,363,874 A describe un

elemento analítico de múltiples capas para detectar un ligando o la capacidad de unión del ligando de una muestra líquida del tipo que tiene una capa de reactivo que incorpora reactivos que responden al ligando o la capacidad de unión del ligando de la muestra para dar una respuesta detectable.

5 Resumen de la invención

Problema técnico

10 Para lograr una alta sensibilidad con un aparato de detección dedicado, el mecanismo de detección en el aparato de detección tiene que ser muy complicado, y por otro lado, es esencial desechar una pieza de prueba (cuerpo principal del kit de POCT) después de su uso para el cual se ha realizado la prueba utilizando una sustancia derivada de un organismo que contiene una sustancia por detectar. Para distribuir la pieza de prueba en los sitios clínicos y adaptar la pieza de prueba a diversos campos, se requiere que el manejo de la pieza de prueba sea simple y que la pieza de prueba sea económica. Para lograr esto, la estructura de la pieza de prueba debe ser simple.

15 La presente invención pretende proporcionar una pieza de prueba inmunocromatográfica que permita lograr la detección altamente sensible de una sustancia por detectar, y una estructura de pieza de prueba simple, que generalmente son difíciles de compatibilizar entre sí.

20 Solución al problema

En la medición que utiliza un aparato de detección tal como un aparato de detección de fluorescencia, una pieza de prueba se irradia con luz de excitación que tiene una longitud de onda constante de una fuente de luz incluida en el aparato de detección. Las partículas que se acumulan en la pieza de prueba y emiten fluorescencia reciben la luz de excitación para emitir fluorescencia que tiene una longitud de onda particular. La luz de una longitud de onda particular emitida por las partículas que emiten fluorescencia se detecta con el aparato de detección.

25 La porción de la pieza de prueba donde se acumulan las partículas que emiten fluorescencia se irradia con la luz de excitación del aparato de detección, sin embargo, las partículas no son irradiadas con toda la luz de excitación, y gran parte de la luz penetra en la parte debajo de la pieza de prueba y no participa en la generación de fluorescencia lo que da como resultado la reducción de la fluorescencia.

30 La pieza de prueba según la presente invención con las características de la reivindicación 1 refleja la luz de irradiación que penetra en la parte debajo de la pieza de prueba al proporcionar un material reflector de luz que refleja la luz de irradiación en la parte inferior de la pieza de prueba, de modo que las partículas acumuladas que emiten fluorescencia son irradiadas eficientemente con la luz de irradiación para amplificar la fluorescencia que se va a generar, es decir, amplificar la luz para ser detectada finalmente. La pieza de prueba de acuerdo con la presente invención no es muy diferente de las piezas de prueba convencionales, y tiene una estructura simple, no una estructura complicada, y sin embargo, la pieza de prueba de acuerdo con la presente invención ha hecho posible detectar una sustancia por detectar, con alta sensibilidad al proporcionar el material reflectante en el mismo.

35 Además, también cuando se usan partículas coloreadas en un rango visible en lugar de las partículas que emiten fluorescencia, al proporcionar el material reflector de luz que refleja la luz de irradiación en la parte debajo de la pieza de prueba, la luz reflejada de la luz de irradiación es atenuada en la porción en donde las partículas se acumulan, debido a la presencia de las partículas, y, por otro lado, la intensidad de la luz que se va a reflejar y detectar en una porción circundante y distinta de la porción en donde se acumulan las partículas, se amplifica para amplificar la luz que va a ser finalmente detectada, lo que hace posible detectar una sustancia por detectar, con alta sensibilidad.

Es decir, la presente invención es como sigue.

50 [1] Una pieza de prueba inmunocromatográfica con las características de la reivindicación 1, que comprende una membrana en donde una sustancia de captura que es un ligando que se une a una sustancia por detectar, está inmovilizada, en donde partículas portadoras insolubles a las que se une un ligando que se une a la sustancia que se detectará está unida y se acumula capturándola con la sustancia de captura inmovilizada en la membrana; la membrana es irradiada con luz para detectar la luz emitida en una porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles o una porción circundante y diferente a la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, midiendo así la sustancia por detectar; y se proporciona un material reflector de luz en un lado de la membrana opuesto a un lado irradiado con luz.

60 [2] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con [1], en donde las partículas portadoras insolubles son partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, y la membrana es irradiada con luz de excitación como luz de irradiación para detectar la fluorescencia emitida desde una porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, midiendo así la sustancia por detectar.

65 [3] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con [1], en donde las partículas portadoras insolubles son partículas portadoras insolubles coloreadas, y la membrana es irradiada con luz de radiación para detectar la luz

reflejada, reflejada en la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles y la porción circundante y diferentes a la porción donde se acumulan las partículas del vehículo insoluble, midiendo así la sustancia por detectar.

[4] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde se utiliza el material reflectante de la luz que tiene una reflectancia total de la luz de irradiación del 85% o más.

[5] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], que además comprende una porción de adición de muestra, una banda de absorción y una porción etiquetada.

[6] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con cualquiera de [1] a [5], en donde el material reflector de luz es un material reflector hecho de un metal.

[7] La pieza de prueba inmunocromatográfica según [6], en donde el metal es aluminio o cobre.

[8] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con [7], en donde la luz de irradiación de 250 nm a 1000 nm se usa cuando el metal es aluminio, y la luz de irradiación de 600 nm a 1000 nm se usa cuando el metal es cobre.

[9] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], en donde material que refleja la luz se proporciona en el lado de la membrana opuesto al lado irradiado con la luz de irradiación para hacer contacto con la membrana.

[10] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con cualquiera de [1] a [9], almacenada en un contenedor de almacenamiento, en donde se proporciona un material reflector de luz en una superficie interna del contenedor de almacenamiento, estando la superficie interna en el lado de la membrana opuesto al lado irradiado con la luz de irradiación.

[11] La pieza de prueba inmunocromatográfica según [10], en donde el material reflector de luz tiene una estructura que recoge la luz de irradiación reflejada cerca de la porción de detección de la pieza de prueba inmunocromatográfica.

[12] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con [10] u [11], en donde el contenedor de almacenamiento está hecho del material reflector de luz.

[13] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en donde la sustancia por detectar, y el ligando que se une a la sustancia por detectar, son un antígeno y un anticuerpo respectivamente, o un anticuerpo y un antígeno respectivamente.

[14] Además, se divulga un método para amplificar la luz de detección en inmunocromatografía que comprende una membrana sobre la cual una sustancia de captura que es un ligando que se une a una sustancia por detectar, se inmoviliza, en donde las partículas portadoras insolubles a las cuales se une un ligando que se une a la sustancia por detectar, se usan y se acumulan al ser capturadas por la sustancia de captura inmovilizada sobre la membrana; y la membrana es irradiada con luz para detectar la luz emitida en una porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles o una porción circundante y diferente a la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, midiendo así la sustancia por detectar, en donde se proporciona un material reflector de luz en un lado de la membrana opuesto a un lado irradiado con luz.

[15] El método para amplificar la luz de detección de acuerdo con [14], en donde las partículas portadoras insolubles son partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, y la membrana es irradiada con luz de excitación como luz de irradiación para detectar la fluorescencia emitida desde la porción donde las partículas portadoras se acumulan, midiendo así la sustancia por detectar.

[16] El método para amplificar la luz de detección de acuerdo con [14], en donde las partículas portadoras insolubles son partículas portadoras insolubles coloreadas, y la membrana es irradiada con luz de irradiación para detectar la luz reflejada, reflejada en la porción en donde se acumulan las partículas portadoras insolubles y la porción circundante y otra distinta a la porción en donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, midiendo así la sustancia por detectar.

[17] El método para amplificar la luz de detección de acuerdo con uno cualquiera de [14] a [16], en donde se usa el material reflector de luz que tiene una reflectancia total de la luz de irradiación del 85% o más.

[18] El método para amplificar la luz de detección de acuerdo con uno cualquiera de [14] a [17], en donde el material reflector de luz es un material reflectante hecho de un metal.

[19] El método para amplificar la luz de detección de acuerdo con [18], en donde el metal es aluminio o cobre.

[20] El método para amplificar la luz de detección de acuerdo con [19], en donde la luz de irradiación de 250 nm a 1000 nm se usa cuando el metal es aluminio, y la luz de irradiación de 600 nm a 1000 nm se usa cuando el metal es de cobre.

5 [21] El método para amplificar la luz de detección de acuerdo con uno cualquiera de [14] a [20], en donde la sustancia por detectar, y el ligando que se une a la sustancia por detectar, son un antígeno y un anticuerpo respectivamente, o un anticuerpo y un antígeno respectivamente.

10 La presente Descripción incluye los contenidos descritos en la Descripción y/o los Dibujos de la Solicitud de Patente Japonesa No. 2013-161691 en los que se basa una reivindicación de prioridad de la presente solicitud.

Efectos ventajosos de la invención

15 En una prueba inmunocromatográfica en donde se usan partículas portadoras insolubles marcadas con colorante fluorescentes o partículas portadoras insolubles coloreadas, y las partículas se acumulan en una pieza de prueba inmunocromatográfica para detectar la fluorescencia emitida por las partículas, o partículas portadoras insolubles coloreadas, y las partículas se acumulan en una pieza de prueba inmunocromatográfica para detectar la luz reflejada en una porción donde se acumulan las partículas y una porción que incluye una porción circundante y diferente a la porción donde se acumulan las partículas, se proporciona un material reflector de luz en la parte inferior de la porción donde las partículas portadoras insolubles se acumulan en la pieza de prueba inmunocromatográfica en la presente invención. De este modo, cuando se usan las partículas portadoras insolubles marcadas con colorante fluorescente, incluso en el caso en que la luz de excitación con la cual se irradia la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles marcadas con colorante fluorescente se transmite a través de la membrana, la luz de excitación se refleja en el material reflector de luz para alcanzar los colorantes fluorescentes, lo cual por lo tanto permite excitar los colorantes fluorescentes. Además, parte de la fluorescencia generada se refleja en el material reflector de luz para ser detectada como luz de detección. Como resultado de ello, la intensidad de la luz de detección que es fluorescencia se amplifica. Además, cuando se usan las partículas portadoras insolubles coloreadas, la luz de irradiación es absorbida por las partículas portadoras insolubles y, por lo tanto, la luz reflejada de la luz de irradiación se atenúa debido a las partículas portadoras insolubles, y, por otro lado, la luz de irradiación se refleja en la porción circundante y distinta de la porción en donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, y la luz reflejada se detecta como luz de detección amplificada. Como resultado de ello, la sensibilidad para detectar una sustancia por detectar puede hacerse alta.

Breve descripción de los dibujos

35 [Figura 1] La Figura 1 muestra diagramas que ilustran el principio de amplificación de la luz de detección cuando se utiliza una pieza de prueba inmunocromatográfica provista de un material reflector de luz de acuerdo con la presente invención; A muestra un caso donde se usan partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, y B muestra un caso donde se usan partículas portadoras insolubles coloreadas.

40 [Figura 2] La Figura 2 es una gráfica que muestra la reflectancia total de diversos metales.

45 [Figura 3] La Figura 3 muestra vistas que ilustran una posición y forma de un material reflector de luz en una pieza o dispositivo de prueba inmunocromatográfica que incluye el material reflector de luz de acuerdo con la presente invención.

[Figura 4] La Figura 4 muestra vistas que ilustran una estructura de una pieza de prueba inmunocromatográfica que incluye un material reflector de luz según la presente invención y una estructura de una pieza de prueba inmunocromatográfica convencional.

50 [Figura 5] La Figura 5 es un diagrama que muestra la fluorescencia en una porción de detección de una pieza de prueba inmunocromatográfica que incluye un material reflector de luz de acuerdo con la presente invención y en una porción de detección de una pieza de prueba inmunocromatográfica convencional.

55 [Figura 6] La Figura 6 muestra vistas que ilustran una estructura de una pieza de prueba inmunocromatográfica que incluye un material reflector de luz de acuerdo con la presente invención y una estructura de una pieza de prueba inmunocromatográfica convencional, y también muestra porciones cortadas en el Ejemplo 2.

60 [Figura 7] La Figura 7 es un gráfico que muestra un efecto de reflexión cuando se utilizan diversos tipos de láminas metálicas como material reflector de luz.

[Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra un efecto de reflexión cuando se utilizan diversos tipos de láminas metálicas como material reflector de luz.

65 [Figura 9-1] La Figura 9-1 es un gráfico que muestra un efecto de reflexión utilizando un material reflector de luz cuando se usan partículas de poliestireno coloreadas.

[Figura 9-2] La Figura 9-2 es un gráfico que muestra la atenuación de la luz reflejada de la luz de irradiación debida a las partículas cuando se usan partículas de poliestireno coloreadas.

Descripción de las Realizaciones

De aquí en adelante, se describirá en detalle la presente invención.

La presente invención es una pieza de prueba para uso en la detección de una sustancia por detectar, por inmunocromatografía. En la inmunocromatografía, una pieza de prueba en donde un ligando que reconoce específicamente y se une a la sustancia por detectar, está unido y un ligando que reconoce específicamente la sustancia por detectar, está unido, se utilizan partículas portadoras insolubles, las partículas portadoras insolubles se unen a la sustancia por detectar, se mueven en la pieza de prueba con una estructura de fibra que utiliza un fenómeno capilar, se unen a una sustancia de captura que se une específicamente a la sustancia por detectar, que está inmovilizada en una porción predeterminada en la pieza de prueba dando como resultado la formación de un complejo de sustancia de captura-sustancia por detectar-partículas portadoras insolubles y acumulación de partículas portadoras insolubles agregadas en una porción predeterminada en la pieza de prueba, siendo irradiada con luz la pieza de prueba que incluye la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, y la acumulación de las partículas portadoras insolubles agregadas se utiliza para detectar la presencia o ausencia de la acumulación de las partículas portadoras insolubles por observación visual o con un aparato de detección que usa luz emitida en la porción de la pieza de prueba como luz de detección, analizando así la presencia o ausencia de la sustancia por detectar.

En la pieza de prueba inmunocromatográfica según la presente invención, se proporciona un material reflector de luz en un lado de la pieza de prueba opuesto a un lado irradiado con luz. Cuando existe la sustancia por detectar, las partículas portadoras insolubles se acumulan en la porción en donde se inmoviliza la sustancia de captura, es decir, en la porción de detección, en la pieza de prueba. Al proporcionar el material reflector de luz, se amplifica la luz de detección que se emite en la porción de detección donde se acumulan las partículas de soporte insolubles en la pieza de prueba y se detecta con un aparato de detección de luz o mediante observación visual. Es decir, se amplifica la luz emitida en la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles en la pieza de prueba, o se amplifica la intensidad de la luz emitida en una porción circundante y distinta de la porción de detección en comparación con la intensidad de la luz emitida en la porción de detección y, como resultado de ello, se amplifica la intensidad de la luz de detección. La luz de detección aquí significa la luz que se emite desde la pieza de prueba después de que la pieza de prueba se irradia con luz y se detecta con un aparato de detección de luz o por observación visual. Específicamente, al utilizar la pieza de prueba inmunocromatográfica provista de un material reflector de luz, el contraste entre la intensidad de la luz emitida en la porción de detección donde se acumulan las partículas de soporte insolubles en la pieza de prueba y la intensidad de la luz emitida en la porción circundante y diferente de la porción de detección se hace grande, y, como resultado de ello, se puede detectar la presencia de partículas portadoras insolubles acumuladas en la porción de detección. La "luz emitida en la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles en la pieza de prueba" en la presente invención incluye la luz emitida desde las partículas portadoras insolubles acumuladas en la porción de detección, la luz reflejada en la porción de detección, o la luz que se refleja en el material reflector de luz provisto en un lado de la pieza de prueba opuesta a un lado irradiado con luz y se detecta a través de la porción de detección. Además, la "luz emitida en una porción circundante y distinta de la porción de detección en la pieza de prueba" incluye la luz reflejada en una porción circundante a la porción de detección, es decir, la luz reflejada en una porción donde las partículas de soporte insolubles en la pieza de prueba no son acumuladas, o la luz que se refleja en el material reflector de luz provisto en el lado de la pieza de prueba opuesta al lado irradiado con luz y pasa a través de la porción diferente a la porción de detección.

Las partículas portadoras insolubles significan partículas que son en sí mismas insolubles en líquido y que se convertirán en portadoras a las que se une un antígeno o anticuerpo y que retienen el antígeno o anticuerpo. En la presente invención, pueden usarse partículas de látex para uso en los campos tecnológicos tales como un fármaco de prueba. Las partículas de látex son partículas que forman una emulsión al dispersarse en agua en forma coloidal. El material de las partículas no está particularmente limitado, sin embargo, pueden usarse materiales para portadores en fase sólida a los que se unen proteínas como un anticuerpo, un antígeno, un ligando y un receptor y que se usan en campos técnicos como un fármaco de prueba. Ejemplos del material incluyen copolímeros de estireno tales como poliestireno, copolímeros de estireno-ácido acrílico, resinas tales como policarbonato, polimetacrilato de metileno (PMMA) y polivinil tolueno, y sílice, celulosa, etc. Entre éstas, son preferibles las partículas basadas en estireno. Las partículas basadas en estireno se refieren a poliestireno o copolímeros de estireno o derivados de estireno con ácido carboxílico insaturado polimerizable, ácidos sulfónicos insaturados polimerizables o similares. Ejemplos del derivado de estireno incluyen clorometilestireno, divinilbenceno, y así sucesivamente, ejemplos del ácido carboxílico insaturado polimerizable incluyen ácido acrílico, ácido metacrílico, y así sucesivamente, y ejemplos del ácido sulfónico insaturado polimerizable incluyen sulfonato de estireno sódico y así sucesivamente. En la presente invención, las partículas de látex basadas en estireno se denominan partículas de látex de poliestireno.

El diámetro de partícula de las partículas que se usan es desde 10 nm a varios cientos de nm, preferiblemente de 30 nm a 500 nm.

Las partículas portadoras insolubles incluyen partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes que están marcadas con un colorante fluorescente y partículas portadoras insolubles coloreadas que están coloreadas con un colorante de pigmento.

Como partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, pueden usarse partículas portadoras insolubles marcadas con un colorante fluorescente uniendo el colorante fluorescente como un agente de marcación fluorescente a las partículas portadoras insolubles. El tipo de colorante fluorescente que está unido a las partículas portadoras insolubles no está limitado, y pueden usarse los colorantes fluorescentes utilizados en el campo de los fármacos de prueba, y otros.

Los ejemplos del colorante fluorescente para uso en el etiquetado fluorescente incluyen colorantes fluorescentes orgánicos que tienen, como un esqueleto básico, fluoresceína, rodamina, cumarina, colorante Cy, Fluor (E) de Alexa (R), EvoBlue, oxazina, carbopironina, naftaleno, bifenilo, antraceno, fenentren, pireno, carbazol, y así sucesivamente, y derivados de los colorantes orgánicos fluorescentes. Además, también se pueden usar complejos de tierras raras como los quelatos de europio (Eu^{3+}) y los quelatos de terbio (Tb^{3+}). Como quelato de europio (Eu^{3+}), se puede usar ATBTA- Eu^{3+} y así sucesivamente que tengan un grupo amino. Además, también se pueden usar proteínas fluorescentes como la proteína fluorescente verde (GFP).

El etiquetado de las partículas portadoras insolubles con el colorante fluorescente se puede realizar de tal manera que se introduzca anticipadamente un grupo funcional como un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo sulfonato, un grupo tiol y un grupo aldehído en las partículas portadoras insolubles, se introduce un grupo funcional también en el colorante fluorescente, y el colorante fluorescente se une a las partículas portadoras insolubles a través de la reacción de unión entre los grupos funcionales. Por ejemplo, el grupo amino y el grupo carboxilo pueden unirse mediante un enlace amida, o los grupos tiol pueden unirse entre sí mediante un enlace disulfuro. Además, los grupos funcionales pueden unirse entre sí utilizando un reactivo de entrecruzamiento. Ejemplos del reactivo de entrecruzamiento incluyen los ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimida, EDAC (clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), glutaraldehído, etc. Además, cuando se usa un complejo de tierras raras como un colorante fluorescente, se puede usar ATBTA- Eu^{3+} o similares en los que se introduce un grupo amino. Además, cuando se usa una proteína fluorescente, se puede utilizar el enlace entre grupos funcionales, sin embargo, la proteína fluorescente también se puede unir a partículas portadoras insolubles haciendo uso de la adsorción física. Como colorante fluorescente en donde se introduce un grupo amino o grupo carboxilo, se pueden usar colorantes fluorescentes disponibles comercialmente.

A continuación, se muestran colorantes fluorescentes que se pueden usar en la presente invención. La longitud de onda de excitación (nm) y la longitud de onda de fluorescencia (nm) de cada colorante fluorescente se muestran como longitud de onda de excitación/longitud de onda de fluorescencia en el paréntesis. La longitud de onda de excitación y la longitud de onda de fluorescencia se vuelven más cortas o más largas dependiendo de la condición de medición o similares. La longitud de onda de excitación y la longitud de onda de fluorescencia se pueden medir dentro de un rango de $\pm$ varias decenas de nm, por ejemplo ± 25 nm a partir de las siguientes longitudes de onda. Los colorantes fluorescentes son solo algunos ejemplos y no están limitados a ellos, y los diversos colorantes fluorescentes se pueden usar con base en sus longitudes de onda de fluorescencia.

Colorantes Fluorescentes Orgánicos

Dylight (R) 405 (400/420), DY-405 (400/420), Cascada Azul (400/420), Alexa Fluor (R) 405 (401/421), AMCA (353/440), Alexa-350 (346/442), AMCA-X (347/447), Pacifico Azul (TM) (405/455), Azul marino (365/460), DY-415 (418/467), Azul real (426/480), ATTO425 (436/484), Cy (TM) 2 (489/505), ATTO465 (453/508), DY-475XL (492/509), Auroras Boreales (TM) 493 (493/514), BODIPY (R) 505/515 (505/515), DY-490 (490/516), DyLight (R) 488 (493/518), Alexa-488 (495/519), 5-FITC (494/519), FAM (495/520), DY-495-X5 (495/520), DY-495 (493/521), Fluoresceína (494/521), FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) (498/522), ATTO488 (501/523), HiLyte Flour (TM) 488 (499/523), MFP488 (501/523), ATTO495 (495/527), OG-488 (496/524), Rhodamine110 (500/525), OG-514 (511/530), Oyster (R) 500 (505/530), Espectro Verde (497/538), Alexa-430 (431/541), ATTO520 (525/545), ATTO532 (532/553), Cas Y (402/554), Alexa-532 (530/554), DY-500XL (505/555), DY-485XL (485/560), Alexa-555 (555/565), HiLyte Plus555 (552/567), DyLight549 (550/568), HiLyte Fluor555 (553/568), Cy3 (550/565), Dylight547 (557/570), rodamina (550/570), TRITC (550/570), DY-548 (558/572), DY-554 (551/572), DY-555 (547/572), Alexa Fluor 546 (556/573), DY-556 (548/573), Auroras Boreales 557 (557/574), Oyster 550 (555/574), 5-TAMRA (547/574), DY-505-X5 (505/574), DY-547 (557/574), Oyster 556 (562/575), DY-549 (560/575), Alexa-546 556/575, ATTO550 (554/576), PE (488/578), B-PE (545/578), R-PE (566/578), DY-560 (559/578), TAMRA (555/580), Tetrametil rodamina (552/578), RITC/TMR (555/580), MFP555 (560/585), Espectro Naranja (559/588), DY-510XL (509/590), Rhodamine B (570/590), ATTO565 (563/592), Cy3.5 (581/596), ROX (Rodamina Roja X) (587/599), DY-590 (580/599), 5-ROX (573/602), Alexa-568 (578/603), BODIPY 580/605 (580/605), Espectro rojo (587/612), ECD (488/613), Rojo de Texas (R) (596/615), DyLight594 (593/618), Alexa Fluor594 (590/619), HiLyte Fluor TR (591/622), ATTO590 (594/624), MFP590 (597/624), DY-610 (610/630), DY-480XL (500/630), ATTO610 (615/634), DY-615 (621/641), C-ficocianina (616/647), ATTO620 (619/643), Alexa-633 (632/647), ficocianina (620/650), DY-481XL (515/650), ATTO633 (629/657), DY-630 (636/657), DY-632 (637/657), DY-633 (637/657), MFP631 (633/658), DyLight633 (638/658), Auroras Boreales 637 (637/658), DY-631 (637/658), DY-634 (635/658), APC (aloficocianina) (650/660), APC-XL (650/660), DY-520XL (520/664), Alexa-647

(650/668), Cy5 (643/667), DY-521XL (523/668), Oyster 645 (650/669), Rojo Quántico (488/670), DY-635 (645/671), DY-636 (645/671), DY-647 (653/673), DyLight647 (652/673), HiLyte Fluor (653/647), DyLight649 (646/674), HiLyte Plus647 (649/674), Oyster650 (655/674), DY-648 (653/674), DY-650 (653/674), PerCP (488/675), DY-652 (654/675), DY-649 (655/676), DY-651 (656/678), Oyster656 (662/679), ATTO655 (663/684), Alexa-660 (663/690), Cy5.5 (675/694), DY-677 (673/694), DY-678 (674/698), HiLyte Fluor680 (678/699), DY-675 (674/699), DY-676 (674/699), IRDye (R) 700DX (689/700), Alexa-680 (679/702), DY-681 (691/708), DY-680 (690/709), DY-682 (690/709), DyLight680 (682/715), Alexa Fluor700 (702/723), DY-700 (707/730), DY-701 (706/731), DY-730 (732/758), DY-732 (736/759), DY-734 (736/759), DY-731 (736/760), DY-752 (748/772), DY-750 (747/776), DyLight750 (752/778), HiLyte Fluor750 (751/778), DY-749 (752/778), HiLyte Plus750 (751/779), DY-751 (751/779), DyLight800 (770/794), IRDye800CW (774/800), DY-780 (782/800), DY-781 (783/800), DY-782 (784/800), DY-776 (771/801), DY-777 (771/801), IRDye800 (778/806), y así sucesivamente.

Complejos de Tierras Raras

ATBTA-EU³⁺ (335/616), y así sucesivamente.

Proteínas Fluorescentes

Sirius (355/424), CFP (452/505), AcGFP (475/505), EGFP (488/509), EYFP (513/527), YFP (514/527), ZsYellow (529/539), mOrange (548/562), DsRed2 (563/582), AsRed2 (576/592), mRFP1 (584/607), mCherry (587/610), HcRed (588/618), mRaspberry (598/625), mPlum (590/649), y así sucesivamente.

Además, también se pueden usar partículas portadoras insolubles hechas de una sustancia que puede emitir fluorescencia. Ejemplos de tales partículas incluyen partículas que consisten en M^IM^{III}O₄ o M^IAl₅O₁₂ (M^I representa itrio (Y), lantano (La) o gadolinio (Gd) y M^{III} representa niobio (Nb), fósforo (P) o vanadio (V)) en las cuales se activa un elemento de tierras raras, como el europio (Eu) o el terbio (Tb), y se pueden usar partículas portadoras insolubles descritas en la publicación de patente japonesa (Kokai) No. 2012-32263. En la presente invención, estas partículas portadoras insolubles hechas de la sustancia que puede emitir fluorescencia también se incluyen en las partículas portadoras insolubles que están marcadas con un colorante fluorescente.

Las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, cuando se irradian con la luz de excitación como luz de irradiación, se excitan para emitir fluorescencia que tiene una longitud de onda diferente de la longitud de onda de la luz de excitación. Por consiguiente, cuando se usan las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, la luz emitida por los colorantes fluorescentes se detecta como luz de detección. Es decir, cuando se usan las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, la luz de detección emitida en la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles significa fluorescencia emitida desde el colorante fluorescente.

En el caso en donde las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes se usan para realizar una prueba usando una pieza de prueba provista de un material reflector de luz, cuando la pieza de prueba que incluye una porción de detección donde las partículas portadoras insolubles se acumulan se irradia con la luz de excitación como luz de irradiación, la luz de excitación excita los colorantes fluorescentes de las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes. Además, parte de la luz de irradiación alcanza una vez el material reflector de luz y es reflejada para excitar los colorantes fluorescentes de las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes. La fluorescencia se emite a partir de los colorantes fluorescentes irradiados con la luz de excitación y se detecta. Además, parte de la fluorescencia emitida se refleja en el material reflector de luz y se detecta. Como resultado de ello, se amplifica la intensidad de la luz de detección que es la fluorescencia.

Las partículas portadoras insolubles coloreadas son partículas portadoras insolubles coloreadas de rango visible, y las partículas portadoras insolubles coloreadas de rango visible significan partículas portadoras insolubles que están coloreadas en un color para que una persona pueda reconocer visualmente el color. Las partículas portadoras insolubles coloreadas de rango visible reflejan rayos visibles que tienen una longitud de onda particular, lo que hace posible que una persona reconozca el color por los rayos visibles reflejados. Los rayos visibles son rayos que tienen una longitud de onda de aproximadamente 380 nm a aproximadamente 750 nm. El color de las partículas coloreadas está representado por el tono como color cromático, el tono incluye rojo, naranja, amarillo, verde, azul, violeta, y así sucesivamente, y una persona reconoce que cada color está coloreado como tal al reflejar los siguientes rayos visibles que tienen longitudes de onda particulares mostrados a continuación.

Rojo 620 a 750 nm

Naranja 590 a 620 nm

Amarillo 570 a 590 nm

Verde 495 a 570 nm

Azul 450 a 495 nm

Violeta 380 a 450 nm

El rango visible de color de las partículas portadoras insolubles se puede producir al teñir las partículas con un colorante de cada color. La tinción con un colorante puede ser tinción en la superficie de las partículas; sin embargo, para evitar el desprendimiento del colorante, es preferible teñir el interior de las partículas y la superficie impregnando las partículas con el colorante. Además, se puede llevar a cabo la tinción con un solo colorante; sin embargo, se pueden obtener partículas portadoras insolubles coloreadas de rango visible coloreadas en un color arbitrario mediante la tinción con una pluralidad de colorantes. Por ejemplo, se pueden producir partículas portadoras insolubles de color de cada color, tales como partículas rojas, partículas azules, partículas verdes, partículas amarillas y partículas rosadas. Se pueden usar colorantes conocidos públicamente que se pueden usar para colorear resinas, y así sucesivamente, y se puede colorear usando un colorante o un pigmento como, por ejemplo, Sudan Blue, Sudan III, Sudan Red IV, Quinizarine Green, y Oil Orange. Además, las partículas hechas de diversos materiales y coloreadas en varios colores se venden en el mercado, y también se pueden usar tales partículas portadoras insolubles de colores vendidas en el mercado.

Las partículas portadoras insolubles coloreadas de rango visible reflejan la luz en el rango de longitud de onda descrito anteriormente de acuerdo con el color y, por otro lado, absorben la luz en un rango de longitud de onda que está en una relación de color complementaria con la luz en el rango de longitud de onda descrito anteriormente. Por ejemplo, las partículas portadoras insolubles rojas absorben la luz del color que está en una relación de color complementaria con el rojo. La longitud de onda de la luz roja es de aproximadamente 620 a 750 nm. El color que está en una relación de color complementaria con el rojo es el color de azul a verde, la longitud de onda de la luz azul es de aproximadamente 450 a 495 nm, y la longitud de onda de la luz verde es de aproximadamente 495 a 570 nm. Además, las partículas portadoras insolubles azules absorben la luz del color que está en una relación de color complementaria con el azul. La longitud de onda de la luz azul es de aproximadamente 450 a 495 nm. El color que está en una relación de color complementaria con el azul es el color de naranja a rojo, la longitud de onda de la luz naranja es de aproximadamente 590 a 620 nm, y la longitud de onda de la luz roja es de aproximadamente 620 a 750 nm.

Cuando las partículas portadoras insolubles coloreadas se usan en la presente invención, es deseable que las partículas portadoras insolubles coloreadas se irradien con la luz en el rango de longitud de onda que puede ser absorbido por las partículas portadoras insolubles coloreadas, a saber, la luz del color rango de longitud de onda que se encuentra en una relación de color complementaria con el color de las partículas portadoras insolubles coloreadas, con el fin de mejorar el contraste entre la intensidad de la luz emitida desde la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles coloreadas en la pieza de prueba y la intensidad de luz emitida desde la porción circundante y distinta de la porción de detección. Como resultado de ello, cuando la luz de irradiación alcanza las partículas portadoras insolubles coloreadas, la mayor parte de la luz se absorbe en lugar de reflejarse, y la intensidad de la luz reflejada de la luz de irradiación se atenúa. Por otro lado, la luz que llega a la porción circundante y distinta de la porción de detección y en donde no se acumulan las partículas portadoras insolubles coloreadas se transmite a través de la pieza de prueba sin ser absorbida, y alcanza el material reflector de luz que se va a reflejar. Parte de la luz reflejada es absorbida adicionalmente por las partículas portadoras insolubles coloreadas o protegidas por las partículas portadoras insolubles coloreadas. Por consiguiente, la luz reflejada de la luz de irradiación se atenúa en la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, y la luz de detección emitida en la porción circundante y distinta de la porción de detección se amplifica. En otras palabras, la luz reflejada en la porción de detección se debilita, y la luz reflejada en la porción circundante y distinta de la porción de detección se hace fuerte. Cuando se usan las partículas portadoras insolubles coloreadas, la luz emitida desde la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles y la luz emitida desde la porción circundante y distinta de la porción de detección significa la luz reflejada de la luz de irradiación. Por consiguiente, la longitud de onda de la luz de irradiación y la longitud de onda de la luz reflejada son las mismas.

La Figura 1 muestra el principio de amplificación de la luz de detección cuando se utiliza una pieza de prueba inmunocromatográfica provista de un material reflector de luz de acuerdo con la presente invención. La Figura 1A muestra un caso en donde se usan partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, y la Figura 1B muestra un caso donde se usan partículas portadoras insolubles coloreadas. Además, los gráficos en las figuras muestran una posición en la pieza de prueba en el eje horizontal y la intensidad de la luz detectada en una posición en la pieza de prueba en el eje vertical. La intensidad de la luz en la Figura 1A que muestra el caso donde se usan las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes es la intensidad de la fluorescencia, y la intensidad de la luz en la Figura 1B que muestra el caso donde se usan las partículas portadoras insolubles coloreadas es la intensidad de Luz reflejada. Las barras debajo de los ejes horizontales en las figuras muestran una porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles. Además, en las figuras, el método convencional es un método en donde se utiliza una pieza de prueba inmunocromatográfica no provista de un material reflector de luz, y el método divulgado en la presente descripción es un método en donde se usa una pieza de prueba inmunocromatográfica provista de un material reflector de luz. Cuando se usan las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, la fluorescencia se vuelve fuerte en la porción donde las partículas portadoras insolubles se acumulan como se muestra en la Figura 1A, sin embargo, la intensidad de la fluorescencia en la porción se amplifica en el método divulgado en la presente descripción cuando se compara con la intensidad de la fluorescencia en el método convencional. Además, cuando se usan las partículas portadoras insolubles coloreadas, la luz reflejada de la luz de irradiación se atenúa en la porción donde las partículas portadoras insolubles se acumulan debido a la influencia de la presencia de las partículas

portadoras insolubles y la luz reflejada se vuelve fuerte en la porción circundante y diferente a la porción donde las partículas portadoras insolubles se acumulan como se muestra en la Figura 1B. Dado que la luz reflejada se vuelve más fuerte en la porción circundante y distinta de la porción en donde se acumulan partículas portadoras insolubles en el método divulgado en la presente descripción cuando se compara con la luz reflejada en el método convencional y la situación no cambia, la luz reflejada no cambia. La luz de irradiación en la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles se atenúa, la intensidad de la luz reflejada se amplifica en la porción circundante y distinta de la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, dando como resultado la amplificación de la luz de detección.

La pieza de prueba inmunocromatográfica según la presente invención está hecha de un material poroso que absorbe agua y tiene un miembro hecho de un material en donde una solución de muestra de espécimen puede moverse debido a un fenómeno capilar, y el miembro se llama membrana. La posición en donde se acumulan las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes o las partículas portadoras insolubles coloreadas se denomina porción de detección, y la membrana incluye una porción de detección donde se inmoviliza una sustancia de captura que puede unirse a una sustancia por detectar. La membrana está hecha de un material que consiste en nitrocelulosa, acetato de celulosa, nailon, polietersulfona, alcohol polivinílico, poliéster, fibra de vidrio, poliolefina, celulosa o fibras mixtas, y preferiblemente está hecha de una membrana de nitrocelulosa. El grosor de la membrana no está particularmente limitado, sin embargo, es preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 μm . Además, la membrana se usa como una tira rectangular, y el tamaño no está particularmente limitado, sin embargo, generalmente es de aproximadamente 3 mm a 9 mm $\times$ aproximadamente 40 mm a 60 mm.

En la porción de detección en la membrana, se inmoviliza un ligando que puede unirse específicamente a una sustancia por detectar, para capturar la sustancia por detectar. La porción de detección a veces se conoce como la porción de captura. En la porción de detección, el ligando se inmoviliza, por ejemplo, en forma de línea. La "porción circundante y distinta de la porción de detección en la pieza de prueba" en la presente invención significa una porción que es adyacente a la porción de detección y está en la pieza de prueba. Cuando la sustancia por detectar, es un antígeno, el ligando que se une a la sustancia por detectar, es típicamente un anticuerpo que se une específicamente al antígeno, y cuando la sustancia por detectar, es un anticuerpo, el ligando es un antígeno al cual el anticuerpo se une específicamente. Además, ejemplos de la combinación de la sustancia por detectar y el ligando incluyen la combinación de un receptor y un ligando, la combinación de un ligando y un receptor, y así sucesivamente. La inmunocromatografía generalmente significa un método de prueba que hace uso del enlace de un anticuerpo y un antígeno, sin embargo, la inmunocromatografía en la presente descripción se interpreta en un sentido amplio e incluye un método de prueba que utiliza una combinación de una sustancia por detectar, y un ligando, distinta de la combinación de un antígeno y un anticuerpo. En lo que sigue, se describe el método de prueba que usa una combinación de un antígeno y un anticuerpo. Cuando la sustancia por detectar, es un antígeno, un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno puede ser inmovilizado, y cuando la sustancia por detectar, es un anticuerpo, se puede inmovilizar un antígeno que el anticuerpo reconoce específicamente. El anticuerpo o antígeno puede inmovilizarse, por ejemplo, en forma de línea o en forma de punto, preferiblemente en forma de línea. La inmovilización puede llevarse a cabo mediante un método conocido públicamente para inmovilizar una proteína en una fase sólida tal como una membrana de nitrocelulosa. Ejemplos del método incluyen un método por el uso de adsorción, un método por el uso de enlaces químicos que hace uso de un grupo funcional como un grupo amino y un grupo carboxilo, y así sucesivamente. Como anticuerpo, se utiliza un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal purificado. Como antígeno, se utiliza un antígeno natural purificado o un antígeno recombinante.

Para la pieza de prueba en donde existe la porción de detección donde está inmovilizado el antígeno o el anticuerpo, una mezcla de una muestra líquida que contiene una sustancia que debe detectarse y partículas portadoras insolubles a las que se une un anticuerpo o antígeno que se une a la sustancia por detectar, se agrega en una porción diferente a la porción de detección en la pieza de prueba, y de ese modo las partículas portadoras insolubles y la sustancia por detectar, se mueven en la pieza de prueba debido a un fenómeno capilar mientras se forma un complejo a través de la reacción antígeno-anticuerpo. La sustancia por detectar, que se ha unido a las partículas portadoras insolubles a través del antígeno o los enlaces de anticuerpos al anticuerpo o antígeno que se inmoviliza en la porción de detección para formar un complejo de anticuerpo inmovilizado o una sustancia-antígeno inmovilizada para detectar partículas portadoras insolubles en la porción de detección. La presencia de partículas portadoras insolubles puede detectarse irradiando la pieza de prueba con luz y midiendo la luz emitida en la porción de detección en la pieza de prueba o en la porción circundante y distinta de la porción de detección en la pieza de prueba, y, como resultado, por lo tanto, se puede detectar la presencia o ausencia de la sustancia por detectar.

Una porción de visualización de control puede existir además en la membrana. La porción de visualización de control es una porción que muestra que una prueba se realizó correctamente. Por ejemplo, la porción de visualización de control existe en el lado corriente abajo de la porción de detección y emite una señal por coloración o similar cuando la muestra de espécimen pasa a través de la porción de detección para alcanzar la porción de visualización de control. En la porción de visualización de control, una sustancia que se une a un ligando que está unido a partículas portadoras insolubles puede inmovilizarse, o un reactivo como un indicador de pH que cambia de color cuando la muestra de espécimen alcanza el reactivo puede inmovilizarse.

La pieza de prueba inmunocromatográfica según la presente invención puede incluir además una porción de adición de muestra, una banda de absorción o una porción etiquetada.

La porción de adición de muestra es una porción donde se agrega una solución de muestra de espécimen, y la solución de muestra de espécimen puede agregarse directamente a la membrana, sin embargo se puede proporcionar en la pieza de prueba una almohadilla de tela no tejida o similar hecha de un material absorbente de agua tal como, por ejemplo, esponja y fibra de vidrio, y la solución de muestra puede ser agregada a la porción. Cuando se usa la almohadilla, la almohadilla se puede llamar almohadilla de muestra. Es preferible proporcionar la porción de adición de muestra en un extremo de la pieza de prueba.

La banda de absorción también se denomina porción de almohadilla de absorción, y se proporciona en un extremo que no es la porción de adición de muestra de la pieza de prueba inmunocromatográfica según la presente invención, y facilita el flujo del líquido de muestra en la pieza de prueba al absorber el líquido de muestra que se mueve en la pieza de prueba después de agregarse a la porción de adición de muestra. La banda de absorción está hecha de un material absorbente de agua para poder absorber una gran cantidad de solución y, por ejemplo, telas no tejidas o similares hechas de celulosa, fibra de vidrio o similares. Además, el tamaño no está particularmente limitado, pero generalmente es de 3 mm a 15 mm × 10 mm a 40 mm, y el grosor es de aproximadamente 0.5 mm a aproximadamente 3 mm.

La porción marcada es una porción en donde está contenido un portador insoluble marcado fluorescente o un portador insoluble coloreado. Como porción etiquetada, se usa un material de tela no tejida o similar hecho de un material absorbente de agua tal como, por ejemplo, esponja y fibra de vidrio, el tamaño no está particularmente limitado, pero generalmente es de 3 mm a 10 mm × 3 mm a 10 mm, el grosor es de aproximadamente 0.5 mm a aproximadamente 3 mm, y las partículas portadoras insolubles están contenidas en un estado seco. Cuando las partículas portadoras insolubles etiquetadas están contenidas en el material absorbente de agua y se usan como la porción marcada, la porción marcada se puede llamar una almohadilla conjugada. Con el fin de preparar la porción marcada, el material absorbente de agua puede impregnarse con partículas portadoras insolubles y secarse. Cuando el lado de la porción de adición de muestra se define como el lado corriente arriba y el lado de la banda de absorción se define como el lado corriente abajo en el caso de que la solución de muestra de espécimen fluya sobre la pieza de prueba desde la porción de adición de muestra hasta la banda de absorción, la porción etiquetada se puede proporcionar en el lado corriente abajo de la porción de adición de muestra y en el lado corriente arriba de la porción de detección. En este caso, la almohadilla de muestra en la porción de adición de muestra puede no necesariamente hacer contacto con la almohadilla conjugada en la porción etiquetada.

Cuando se agrega una muestra líquida a la porción de muestra de espécimen en la pieza de prueba, la muestra líquida se mueve a la porción etiquetada debido a un fenómeno capilar, las partículas de soporte insolubles contenidas en la porción marcada se disuelven en la muestra líquida, y el antígeno o anticuerpo que está unido a las partículas portadoras insolubles se une a la sustancia que se detectará en la muestra líquida y se mueve hacia abajo en la membrana de la pieza de prueba a la vez que se forma un complejo. La sustancia por detectar, que está unida a las partículas portadoras insolubles a través del antígeno o los enlaces de anticuerpos al anticuerpo o antígeno inmovilizado en la porción de detección, por lo tanto, el complejo de las partículas portadoras insolubles y la sustancia por detectar, es capturada por el anticuerpo o el antígeno inmovilizado en la porción de detección, y las partículas portadoras insolubles se acumulan en la porción de detección. El resto de la muestra líquida pasa a través de la porción de detección y es absorbida por la banda de absorción.

La pieza de prueba de acuerdo con la presente invención puede incluir una lámina de soporte. La lámina de soporte también se puede denominar lámina de soporte y se usa para revestir la membrana, la porción de adición de muestra, la banda de absorción y la porción etiquetada. La membrana, la porción de adición de muestra, la banda de absorción y la porción etiquetada pueden adherirse a la lámina de soporte. La lámina de soporte es una lámina hecha de plástico o similar que el líquido no impregna, sostiene la membrana y otros miembros, como la porción de adición de muestra, para que se mantenga en una estructura o resistencia constante, y puede evitar que la muestra de espécimen salga de la pieza de prueba. Cuando existe la lámina de soporte, una pieza de prueba que incluye la lámina de soporte también se conoce como pieza de prueba. La lámina de soporte puede existir entre la membrana y el material reflector de luz que se describirá más adelante, o puede existir en la parte inferior del material reflector de luz. Cuando la lámina de soporte existe en la parte inferior del material reflector de luz, la lámina de soporte puede estar hecha de una materia prima que no transmite luz, sin embargo, cuando la lámina de soporte existe entre la membrana y el material reflector de luz, se requiere que la lámina de soporte esté hecha de una materia prima que transmita luz sin una atenuación notable, como, por ejemplo, un plástico transparente.

La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la presente invención se almacena en un contenedor de almacenamiento, y la degradación causada por, por ejemplo, rayos ultravioleta o humedad en el aire puede evitarse mediante el contenedor de almacenamiento. Además, cuando se utiliza una muestra de espécimen que puede contener un microorganismo infeccioso, como un virus o una bacteria, el contenedor de almacenamiento hace posible evitar que un examinador que realiza un ensayo haga contacto con estos microorganismos. Por ejemplo, un estuche hecho de resina que tiene un tamaño apropiado puede usarse como contenedor de almacenamiento para almacenar el dispositivo de acuerdo con la presente invención en el caso. Además, la superficie de la pieza de prueba en donde

está inmovilizado un antígeno o anticuerpo puede cubrirse (laminado superior) con una película hecha de resina o similar. El contenedor de almacenamiento y la pieza de prueba almacenados en él se conocen como un dispositivo inmunocromatográfico en forma de una unidad integrada.

5 En la pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la presente invención, se proporciona un material reflector de luz en el lado opuesto al lado irradiado con luz en la pieza de prueba que incluye la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, por lo tanto, la luz de irradiación que se transmite a través de la pieza de prueba en circunstancias normales alcanza el material reflector de luz que se va a reflejar.

10 Como material reflector de luz, se puede usar cualquier material siempre y cuando el material pueda reflejar la luz de irradiación. Además, el material reflector de luz se puede formar a partir de una sustancia que refleja la luz, o un material que no refleja la luz en circunstancias normales puede estar cubierto con un material reflector de luz. Ejemplos de sustancia que refleja la luz incluyen sustancias inorgánicas como metales, vidrio, mica y sílice. La sustancia que refleja la luz es preferiblemente un metal, y es preferible que el propio material reflector de luz esté hecho de un metal.
15 Es preferible que el metal tenga una alta reflectancia de la luz, y ejemplos del metal preferible incluyen aluminio, tantalio, níquel, wolframio, cobre, latón, níquel-titanio, oro, platino, etc., y aleaciones de los mismos. La superficie del material reflector de luz puede tratarse de modo que tenga un brillo para realizar la reflexión especular de la luz, o para dejar que la rugosidad de la superficie realice la reflexión por difusión de la luz, sin embargo, es preferible que la superficie del material reflectante de la luz se trate para llevar a cabo una reflexión especular. Además, ejemplos de cobertura de material que no refleja la luz en circunstancias normales con material reflector de luz incluyen un material reflector de luz en donde la superficie formada a partir de una sustancia como una resina está recubierta con un metal. Además, la superficie también puede recubrirse con un polvo metálico para formar una película metálica. La formación de una película delgada metálica sobre la superficie se puede realizar mediante un método tal como recubrimiento, pulverización catódica o deposición de vapor. Además, una película gruesa (por ejemplo, un espesor de película de 5 a 20 μm) también puede formarse mediante un revestimiento electrolítico de níquel-fósforo.
20
25

La longitud de onda de la luz donde la reflectancia es alta es diferente dependiendo del metal. Por consiguiente, cuando se usa un metal como material reflector de luz, el tipo de metal puede seleccionarse de acuerdo con la longitud de onda de la luz de irradiación. Es decir, se puede seleccionar el metal que tiene una alta reflectancia a la luz en la longitud de onda de la luz de irradiación con la cual se irradia la porción de detección. La reflectancia de un metal a la longitud de onda de la luz puede determinarse midiendo un espectro de reflexión del metal con un espectrofotómetro o similar. Por consiguiente, se puede medir el espectro de reflexión de cada metal para usar el metal que tenga una alta reflectancia en la longitud de onda de la luz de irradiación que se va a usar. La Figura 2 muestra la reflectancia total de metales como el aluminio y el cobre (la figura es citada de Mc Leed. "Thin film optical filters", A. Hilger, Londres, 1985). En la Figura 2, el eje horizontal muestra la longitud de onda, y el eje vertical muestra la reflectancia total. Por ejemplo, la combinación de la longitud de onda de la luz de irradiación y el metal se puede seleccionar con referencia a la figura.
30
35

Por ejemplo, se puede usar la combinación de la longitud de onda y el metal donde la reflectancia total con un ángulo de incidencia de 45° es 80% o más, preferiblemente 85% o más, aún más preferiblemente 90% o más, particularmente preferiblemente 95% o más.
40

Por ejemplo, el aluminio tiene una reflectancia total del 85% o más en un rango de 250 nm a 1000 nm y, por lo tanto, se puede usar para irradiar luz de 250 nm a 1000 nm. Además, el cobre tiene una reflectancia total del 90% o más a la luz que tiene una longitud de onda de 600 nm o más, y por lo tanto, cuando se usa la luz de irradiación de 600 nm a 1000 nm, se puede usar cobre.
45

Además, la pieza de prueba inmunocromatográfica se usa una vez y luego se tira, por lo cual es preferible un metal disponible a un bajo coste para reducir los costes de producción del aparato, y desde este punto de vista, son preferibles el aluminio y el cobre.
50

En la pieza de prueba inmunocromatográfica, es preferible utilizar un material que refleje la luz, similar a una lámina o similar a una hoja. Se puede usar hojas de aluminio y hojas de cobre como material reflector de luz, y se pueden usar hojas de aluminio y hojas de cobre disponibles en el mercado.
55

Cuando la pieza de prueba transmite la luz de irradiación con la cual se irradia la porción de detección de la pieza de prueba inmunocromatográfica, el material reflector de luz se utiliza para reflejar la luz de irradiación. Por consiguiente, el material reflector de luz se proporciona en el lado que se irradia con luz a la pieza de prueba inmunocromatográfica, es decir, en el lado opuesto al lado donde existe una fuente de luz. Por lo general, la pieza de prueba inmunocromatográfica, cuando se usa, se coloca horizontalmente con la cara en donde se inmoviliza el anticuerpo o antígeno al revés. Por consiguiente, el material reflector de luz se proporciona en la parte inferior de la pieza de prueba inmunocromatográfica. En la invención de la presente solicitud, la posición en donde se proporciona el material reflector de luz se conoce como la parte inferior de la pieza de prueba, sin embargo, la parte inferior de la pieza de prueba significa el lado opuesto al lado que se irradia con luz, no determinado por la base lateral superior o inferior en la dirección en donde actúa un campo gravitatorio.
60
65

El material reflector de luz se proporciona al menos en la parte de abajo o en la parte inferior de la porción de detección en la pieza de prueba. El tamaño del material reflector de luz puede ser el tamaño mediante el cual se puede cubrir al menos la porción de detección en la pieza de prueba, sin embargo, se usa preferiblemente el material reflector de luz cuyo tamaño es mayor que el tamaño de la porción de detección para que la irradiación de la luz que se transmite a través de la porción circundante y diferente a la porción de detección pueda reflejarse, y, por ejemplo, se usa el material reflector de luz que tiene el tamaño que cubre toda la membrana en la pieza de prueba.

El material reflector de luz está integrado con la pieza de prueba, también se puede integrar con el contenedor de almacenamiento para la pieza de prueba, y se puede almacenar junto con la pieza de prueba en el contenedor de almacenamiento para la pieza de prueba. Además, la propia lámina de soporte puede ser un material reflector de luz y, por ejemplo, la lámina de aluminio o la lámina de cobre se puede usar como lámina de soporte.

La Figura 3 ilustra ejemplos de realización en los que se cambia la posición en donde se proporciona el material reflector de luz o se cambia la forma del material reflector de luz en la pieza de prueba inmunocromatográfica o el dispositivo inmunocromatográfico que incluye un recipiente de almacenamiento de acuerdo con la presente invención. En la Figura 3, a representa una banda de absorción, b representa una membrana, b' representa una porción de detección en la membrana, c representa una almohadilla conjugada, d representa una almohadilla de muestra, e representa una lámina de soporte, f representa un material reflector de luz, g representa una lámina de soporte que transmite luz, y h representa un contenedor de almacenamiento.

La Figura 3A ilustra un Ejemplo de Realización que se utiliza en la inmunocromatografía convencional que no utiliza un material reflector de luz. La Figura 3B1 y la Figura 3B2 muestran vistas que ilustran el Ejemplo de Realización 1 y el Ejemplo de Realización 2 de las piezas de prueba inmunocromatográficas provistas de un material reflector de luz según la presente invención, y el material reflector de luz está integrado con la pieza de prueba. La Figura 3B3, la Figura 3B4 y la Figura 3B5 muestran vistas que ilustran los Ejemplos de Realización 3, 4 y 5, donde la pieza de prueba se almacena en el contenedor de almacenamiento al que está unido un material reflector de luz, el material reflector de luz se almacena en el contenedor de almacenamiento, junto con la pieza de prueba en los dispositivos ilustrados en la Figura 3B3 y la Figura 3B4, y el material reflector de luz está integrado con el contenedor de almacenamiento en el aparato ilustrado en la Figura 3B5. En la pieza de prueba inmunocromatográfica ilustrada en la Figura 3B1, el material reflector de luz f está provisto en la parte inferior de la porción de detección b' de la membrana b para hacer contacto con la membrana b, y la lámina de soporte e está más pegada a la parte inferior de la membrana b. En la pieza de prueba inmunocromatográfica ilustrada en la Figura 3B2, la lámina de soporte g está pegada al lado inferior de la membrana b, y el material reflector de luz f está provisto adicionalmente en la parte inferior de la lámina de soporte. En el aparato ilustrado en la Figura 3B1, la lámina de soporte e puede ser un material que protege de la luz, sin embargo, en el aparato ilustrado en la Figura 3B2, se requiere que la lámina de soporte g esté hecha de un material que sea transparente y transmita luz.

La Figura 3B3, la Figura 3B4 y la Figura 3B5 ilustran dispositivos en los que la pieza de prueba se almacena en el contenedor de almacenamiento, y el material reflector de luz f se proporciona en la superficie interior del contenedor de almacenamiento h. En el dispositivo inmunocromatográfico ilustrado en la Figura 3B3, el material reflector de luz f se proporciona en la superficie interior del contenedor de almacenamiento h que corresponde a la parte inferior de la porción de detección b' en la pieza de prueba. En el dispositivo inmunocromatográfico ilustrado en la Figura 3B4, el material reflector de luz f está unido a la posición similar a la posición en el aparato ilustrado en la Figura 3B3, sin embargo, el material reflector de luz f se procesa para tener una superficie curva, y la luz reflejada se recoge en la porción de detección b' y la porción circundante a la porción de detección b' en la pieza de prueba debido a la presencia de la superficie curva. Es decir, el material reflector de luz f en el aparato ilustrado en la Figura 3B3 tiene una superficie curva por la cual la luz reflejada se enfoca en la porción de detección b' y la porción circundante a la porción de detección b' en la pieza de prueba. La forma del material reflector de luz no está limitada, y puede tener una estructura hemisférica, una estructura semicilíndrica o una estructura poliédrica siempre que la luz de irradiación se refleje para alcanzar de manera eficiente la pieza de prueba inmunocromatográfica que incluye una porción de detección debido a su estructura. Además, en el dispositivo inmunocromatográfico ilustrado en la Figura 3B5, la propia superficie interna del contenedor de almacenamiento h es un material reflector de luz. En este caso, toda la superficie interna del contenedor de almacenamiento puede ser un material reflector de luz, o parte de la superficie interna del contenedor de almacenamiento puede ser un material reflector de luz. Además, el propio contenedor de almacenamiento está formado de un material reflector de luz, como el aluminio o el cobre, o la superficie interior del contenedor de almacenamiento puede estar recubierta con aluminio o cobre.

La sustancia por detectar, y la muestra de espécimen que se detecta utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica según la presente invención no están limitadas. Por ejemplo, como una solución de muestra de espécimen, una muestra de faringe o cavidad nasal, un aspirado de cavidad nasal, un líquido de lavado de faringe o cavidad nasal, saliva, suero, plasma sanguíneo, sangre entera, una suspensión de heces, orina, una solución de cultivo. Se pueden usar soluciones diluidas de los mismos, diluidas con una solución reguladora, así sucesivamente. La sustancia por detectar, tampoco está limitada en absoluto, y se puede usar cualquier sustancia que se pretenda detectar. Ejemplos de las sustancias por detectar, incluyen antígenos de virus tales como virus de influenza, adenovirus, virus RS y virus de tipo Norwalk, antígenos bacterianos tales como la bacteria Legionella, estreptococo

hemolítico y MRSA, y antígenos tales como hormonas, y los ejemplos incluyen además anticuerpos contra las bacterias, virus, etc. descritos anteriormente.

En el método de detección que utiliza la pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la presente invención, se realiza una prueba inmunocromatográfica para irradiar las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes o partículas portadoras insolubles coloreadas acumuladas en la porción de detección en la pieza de prueba con luz.

Cuando las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes se usan en un ensayo que utiliza la pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la presente invención, la pieza de prueba que incluye la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles se irradia con la luz de excitación desde arriba de la pieza de prueba. La luz de excitación con la cual se irradia la pieza de prueba excita los colorantes fluorescentes de las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes acumuladas en la porción de detección en la pieza de prueba para generar fluorescencia. Dado que el material reflector de luz se proporciona en el lado de la pieza de prueba opuesto al lado irradiado con la luz de excitación en la pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la presente invención, la luz de excitación con la cual se irradia la pieza de prueba se refleja en el material reflector de luz, lo que permite amplificar la intensidad de la luz de excitación que llega a los colorantes fluorescentes de las partículas portadoras insolubles acumuladas en la porción de detección. Además, parte de la fluorescencia generada por la irradiación de la luz de excitación también se refleja en el material reflector de luz para ser detectada como luz de detección. Por lo tanto, los colorantes fluorescentes se excitan eficientemente para generar fluorescencia y se amplifica la intensidad de la fluorescencia emitida en la porción de detección en la pieza de prueba. Dado que los colorantes fluorescentes no existen en la porción circundante que no sea la porción de detección y donde no existen partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, la fluorescencia no se emite y el contraste entre la fluorescencia emitida en la porción de detección y la fluorescencia emitida a la porción circundante y diferente de la porción de detección, se vuelven altas para amplificar la luz detectada, lo que hace posible detectar la acumulación de partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes en la porción de detección en la pieza de prueba con alta sensibilidad. Como resultado de ello, se posibilita la detección de una sustancia por detectar, con alta sensibilidad.

La medición de la fluorescencia se puede realizar utilizando un aparato de detección de fluorescencia que incluye medios de irradiación de luz que irradian la pieza de prueba con los medios de luz de excitación y luz de detección que detecta la fluorescencia generada. Como tal aparato, pueden usarse aparatos de detección de fluorescencia conocidos por el público. Además, puede diseñarse adecuadamente un aparato que detecta la fluorescencia incluyendo una porción que almacena un dispositivo que incluye una pieza de prueba o contenedor de almacenamiento y proporcionando la pieza de prueba o dispositivo en la porción. Además, la medición de la fluorescencia también se puede realizar mediante observación visual. Cuando un antígeno particular se mide como una sustancia por detectar, la concentración del antígeno contenida en una muestra de espécimen puede determinarse a partir de la intensidad de la fluorescencia obtenida de tal manera que la intensidad de la fluorescencia se obtenga cuando la concentración del antígeno cambiado se mide de antemano para hacer una curva de calibración basada en los valores medidos.

Además, cuando se usan las partículas portadoras insolubles coloreadas, la pieza de prueba que incluye la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles se irradia con luz desde arriba de la pieza de prueba. Parte de la luz con la cual se irradia la pieza de prueba es absorbida por las partículas portadoras insolubles coloreadas. Además, parte de la luz con la cual se irradia la pieza de prueba se transmite a través de la pieza de prueba y se refleja en el material reflector de luz provisto en el lado de la pieza de prueba opuesto al lado irradiado con luz. La luz reflejada, cuando alcanza las partículas portadoras insolubles coloreadas, es absorbida por las partículas portadoras insolubles de nuevo o protegida por las partículas portadoras insolubles. Por otro lado, la porción circundante y diferente de la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles se irradia con parte de la luz con la cual se irradia la pieza de prueba y la parte de la luz con la cual se irradia la pieza de prueba se transmite a través de la pieza de prueba se reflejará en el material reflector de luz provisto en el lado de la pieza de prueba opuesto al lado irradiado con luz para ser detectado como luz de detección sin alcanzar las partículas portadoras insolubles. Por lo tanto, la luz reflejada de la luz de irradiación se atenúa debido a las partículas portadoras insolubles acumuladas en la pieza de prueba, la intensidad de la luz emitida en la porción de detección, es decir, la luz que se va a reflejar disminuye, y la intensidad de la luz emitida a la porción circundante y distinta de la porción de detección en donde se acumulan las partículas portadoras insolubles en la pieza de prueba, es decir, la luz que se va a reflejar, se aumenta. Como resultado de ello, el contraste entre la luz emitida en la porción de detección donde se acumulan las partículas portadoras insolubles en la pieza de prueba y la luz emitida en la porción circundante y diferente a la porción de detección donde las partículas portadoras insolubles en la pieza de prueba se acumulan, se incrementa para amplificar la luz detectada, lo que hace posible detectar la acumulación de partículas portadoras insolubles coloreadas en la porción de detección en la pieza de prueba con alta sensibilidad. Como resultado de ello, se posibilita la detección de una sustancia por detectar, con alta sensibilidad.

La medición de la luz de irradiación reflejada se puede realizar utilizando un aparato de detección de luz que incluye medios de detección de luz que detectan luz. Como un aparato de este tipo, se puede usar un lector dedicado para inmunocromatografía, por ejemplo. Además, la medición de la luz de irradiación reflejada también se puede realizar mediante observación visual. Cuando un antígeno particular se mide como una sustancia por detectar, la concentración del antígeno contenida en una muestra de espécimen puede determinarse a partir de la intensidad de

la luz obtenida de tal manera que la intensidad de la luz se obtenga cuando la concentración del antígeno cambiado se mide de antemano para hacer una curva de calibración basada en los valores medidos.

A continuación, se describirán un método para detectar un antígeno de virus en un suero utilizando la pieza de prueba como se muestra en la Figura 3B2 de acuerdo con la presente invención y las partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes en combinación como un ejemplo de detección de una sustancia por detectar, usando la pieza de prueba inmunocromatográfica según la presente invención.

En la membrana b, existe la porción de detección b' donde un antígeno/anticuerpo antiviral está inmovilizado en forma de línea. La almohadilla conjugada c está impregnada con partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes a las que se une el antígeno/anticuerpo antiviral, y la almohadilla conjugada c es secada a continuación. Una muestra de espécimen líquida que contiene un antígeno del virus por detectar se agrega a la almohadilla de la muestra desde varias decenas de μl a varios cientos de μl . El líquido de muestra de espécimen fluye desde la almohadilla de muestra a la almohadilla conjugada, y disuelve las partículas portadoras insolubles con las cuales se impregna y se seca la almohadilla conjugada. Cuando el líquido de la muestra de espécimen disuelve las partículas portadoras insolubles y fluye corriente abajo, el antígeno/anticuerpo antiviral que está unido a las partículas portadoras insolubles se une a un antígeno vírico para formar un complejo de partículas portadoras insolubles antígeno antiviral. Cuando el complejo alcanza la porción de detección en la membrana, el antígeno del virus es capturado por el antígeno/anticuerpo antiviral inmovilizado en la porción de detección y se forma un complejo de antígeno/anticuerpo antiviral/antígeno de virus-partículas portadoras insolubles en la porción de detección. El resto del líquido de la muestra de espécimen pasa a través de la porción de detección para moverse hacia abajo en la membrana y es absorbido por la banda de absorción. Los colorantes fluorescentes de las partículas portadoras insolubles, cuando se irradian con la luz de excitación, emiten fluorescencia. La luz de excitación que se transmite a través de la membrana se refleja en el material reflector de luz que se encuentra en la parte inferior de la membrana para excitar nuevamente los colorantes fluorescentes y se amplifica la intensidad de la fluorescencia.

Además, cuando se usan las partículas portadoras insolubles coloreadas, se puede formar un complejo de antígeno/anticuerpo antiviral/antígeno de virus-partículas portadoras insolubles en la porción de detección de la misma manera que se describió anteriormente, y la pieza de prueba se puede irradiar con luz.

La presente invención incluye además un kit inmunocromatográfico que incluye la pieza de prueba inmunocromatográfica o dispositivo inmunocromatográfico de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

La presente invención se describirá específicamente mediante los siguientes Ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada por estos Ejemplos. En la descripción de los Ejemplos, % denota % en peso.

Ejemplo 1 Amplificación de la luz de detección emitida a partir de partículas de poliestireno fluorescentes con lámina de metal (aluminio) provista en la parte inferior de la pieza de prueba inmunocromatográfica

1. Se diluyó IgG de ratón, purificada por cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A, con agua purificada para obtener 1.0 mg/mL, se agregaron partículas de poliestireno fluorescentes (fabricadas por Thermo Fisher Scientific Inc.: nombre del producto; Fluoro Max) que contenían un quelato de europio (Eu^{3+}) para llegar al 0.1%, con agitación, luego se añadió carbodiimida para llegar al 1%, y la mezcla resultante se agitó adicionalmente. El sobrenadante se eliminó mediante una operación centrífuga, y el resto de la mezcla se resuspendió en Tris 50 mM (pH de 9.0) y BSA al 3% para obtener partículas de poliestireno fluorescentes marcadas con anticuerpos derivados de ratón.

2. Inmovilización del anticuerpo IgG anti-ratón en membrana de nitrocelulosa. Se aplicó un líquido obtenido diluyendo el anticuerpo IgG anti-ratón con agua purificada para obtener una dosis de 1.0 mg/ml en forma de línea en una porción predeterminada de una membrana de nitrocelulosa revestida con una película de PET, y se secó a 45°C durante 30 minutos para obtener una membrana inmovilizada por anticuerpos (en lo sucesivo, denotada como membrana inmovilizada por anticuerpos).

3. Acumulación de partículas marcadas en la porción inmovilizada por inmunocromatografía. La membrana inmovilizada con anticuerpo obtenida en 2, una lámina de soporte, una banda de absorción, una almohadilla conjugada y una almohadilla de muestra fueron adheridas entre sí para formar una pieza de prueba, y la pieza de prueba que no contenía un material reflector de luz se denotó como una pieza de prueba convencional. (Figura 4A). Además, los miembros se adhirieron para hacer una pieza de prueba sosteniendo una lámina metálica de lámina de aluminio como material reflector de luz debajo de la membrana inmovilizada con anticuerpo y en la lámina de soporte, y la pieza de prueba que incluye el material reflector de luz fue denotada como pieza de prueba del método divulgado en la presente descripción (Figura 4B).

En la almohadilla de muestra de la pieza de prueba, se depositaron 50 μl de un líquido con espécimen suspendido (Tris 10 mM (pH 7.0), BSA al 3% y Triton X-100 al 0.2%). Después de dejar la mezcla resultante en reposo durante 15

minutos, se confirmó la fluorescencia mediante observación visual en un transiluminador UV (transiluminador Benchtop 2UV; fabricado por UVP, LLC).

Como resultado, pudo confirmarse la acumulación de partículas de poliestireno fluorescentes en la porción donde se inmovilizó el anticuerpo. Se pudo confirmar que la intensidad de la luz emitida desde la pieza de prueba del método divulgado en la presente descripción aumentó claramente en observación visual en comparación con la intensidad de la luz emitida desde la pieza de prueba convencional (Figura 5).

A partir de los resultados anteriores, es posible amplificar la luz de detección utilizando la pieza de prueba preparada de acuerdo con el presente método. La fluorescencia se evalúa mediante observación visual en el presente Ejemplo, sin embargo, se considera que la fluorescencia se puede detectar con una sensibilidad más alta detectando la fluorescencia con un aparato.

Ejemplo 2. Amplificación de la luz de detección emitida a partir de partículas de poliestireno fluorescentes con diversas láminas metálicas provistas en la parte inferior de la pieza de prueba inmunocromatográfica

1. Se diluyó IgG de ratón, purificada por cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A, con agua purificada para llegar a 1.0 mg/ml, se añadieron partículas de poliestireno fluorescentes que contenían un quelato de europio a un 0.1% en agitación, luego se añadió carbodiimida hasta llegar a 1%, y la mezcla resultante se agitó adicionalmente. El sobrenadante se eliminó mediante una operación centrífuga, y el resto de la mezcla se resuspendió en Tris 50 mM (pH de 9.0) y BSA al 3% para obtener partículas de poliestireno fluorescentes marcadas con anticuerpos derivados de ratón.

2. Inmovilización del anticuerpo IgG anti-ratón en la membrana de nitrocelulosa. Se aplicó un líquido obtenido diluyendo el anticuerpo IgG anti-ratón con agua purificada para obtener una dosis de 1.0 mg/ml en forma de línea en una porción predeterminada de una membrana de nitrocelulosa revestida con una película de PET, y se secó a 45°C durante 30 minutos. para obtener una membrana inmovilizada por anticuerpos (en lo sucesivo, denotada como membrana inmovilizada por anticuerpos).

3. Acumulación de partículas de poliestireno fluorescentes en la porción inmovilizada por inmunocromatografía. La membrana inmovilizada con anticuerpo obtenida en 2, una lámina de soporte, una banda de absorción, una almohadilla conjugada y una almohadilla de muestra se adhirieron entre sí para formar una pieza de prueba, y la pieza de prueba que no contenía un material reflector de luz se denotó como una pieza de prueba convencional (Figura 6A). Además, los miembros fueron adheridos para hacer una pieza de prueba sosteniendo una lámina de metal (aluminio, cobre y acero inoxidable) como un material reflector de luz debajo de la membrana inmovilizada con anticuerpo y en la lámina de soporte, y la pieza de prueba que incluye el material reflectante de luz se denotó como una pieza de prueba del método divulgado en la presente descripción (Figura 6B).

En la almohadilla de muestra de la pieza de prueba, se depositaron 50 µl de un líquido con espécimen suspendido (Tris 10 mM (pH de 7.0), BSA al 3% y Triton X-100 al 0.2%). Después de dejar la mezcla resultante durante 15 minutos, se cortó una porción (h) rodeada por un cuadrado en la Figura 6 en la porción inmovilizadora de anticuerpos de la pieza de prueba y se irradió con luz de irradiación (365 nm) con un lector de placa de fluorescencia (MTP-650FA MICROPLATE READER; fabricado por CORONA ELECTRIC Co., Ltd.) para medir la intensidad de la luz de detección (615 nm) emitida por las partículas de poliestireno fluorescente.

Como resultado, la intensidad de la fluorescencia emitida se amplificó claramente utilizando la lámina de aluminio, en comparación con la intensidad de la fluorescencia emitida obtenida de la pieza de prueba convencional, y también se observó amplificación en los casos de lámina de cobre y lámina de acero inoxidable. El alcance de la amplificación de la luz de detección fue más notable en la lámina de aluminio cuando se realizó una comparación entre las tres láminas (Figura 7).

La reflectancia específica de un material reflector de luz existe dependiendo de la longitud de onda (Figura 2). El aluminio utilizado en el presente Ejemplo refleja de manera eficiente la luz de irradiación que tiene una longitud de onda de 365 nm con una reflectancia de aproximadamente el 90% y, por otro lado, el cobre refleja la luz de irradiación que tiene una longitud de onda de 365 nm con una reflectancia del 40% o menos.

El hecho de que el aluminio tuviera un mayor grado de amplificación de la luz de detección que el cobre en el presente Ejemplo muestra que la eficiencia de reflexión del material reflector de luz con respecto a la luz de irradiación es importante en el presente método.

En el presente Ejemplo, la luz que tenía una longitud de onda de 365 nm se usó como luz de irradiación, sin embargo, la longitud de onda de la luz de irradiación no está limitada a 365 nm. Cuando la luz que tiene una longitud de onda de 600 nm se utiliza como luz de irradiación, tanto el cobre como el aluminio reflejan eficientemente la luz con una reflectancia de aproximadamente el 90% y se puede decir que el cobre es efectivo como material reflector de luz a la luz de irradiación que tiene una longitud de onda de 600 nm. Cuando se usaron partículas que emiten fluorescencia a

600 nm al ser excitadas a 570 nm y se irradiaron con la luz de irradiación que tiene una longitud de onda de 490 nm y se detectó fluorescencia a 615 nm, la luz de detección fue amplificada por el cobre igual que el aluminio (Figura 8).

Es importante seleccionar una materia prima que refleje eficientemente la longitud de onda de la luz de irradiación, independientemente de la longitud de onda de la luz de irradiación que se vaya a utilizar.

Ejemplo 3. Amplificación de la luz de detección con material reflector de luz provisto en la parte inferior de la pieza de prueba inmunocromatográfica cuando se usan partículas de poliestireno coloreadas

1. Se diluyó IgG de ratón purificada por cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A, con agua purificada para llegar a 1.0 mg/ml, se le añadieron partículas de poliestireno de color rojo a un 0.1% para agitar, luego se añadió carbodiimida para llegar al 1%, y la mezcla resultante se agitó adicionalmente. El sobrenadante se eliminó mediante una operación centrífuga y el resto de la mezcla se resuspendió en Tris 50 mM (pH de 9.0) y BSA al 3% para obtener partículas de poliestireno coloreadas marcadas con anticuerpos derivados de ratón.

2. Inmovilización del anticuerpo IgG Anti-Ratón en la Membrana de Nitrocelulosa. Se aplicó un líquido obtenido diluyendo el anticuerpo IgG anti-ratón con agua purificada para obtener una dosis de 1.0 mg/ml en forma de línea en una porción predeterminada de una membrana de nitrocelulosa revestida con una película de PET, y se secó a 45°C durante 30 minutos. para obtener una membrana inmovilizada por anticuerpos (en lo sucesivo, denotada como membrana inmovilizada por anticuerpos).

3. Acumulación de Partículas de Poliestireno Coloreadas en la Porción Inmovilizada por Inmunocromatografía. La membrana inmovilizada con anticuerpo obtenida en 2, una lámina de soporte, una banda de absorción, una almohadilla conjugada y una almohadilla de muestra se adhirieron entre sí para formar una pieza de prueba, y la pieza de prueba que no contenía un material reflector de luz se denotó como una pieza de prueba convencional (Figura 4A). Además, los miembros se adhirieron para hacer una pieza de prueba sosteniendo un material reflector de luz debajo de la membrana inmovilizada con anticuerpo y en la lámina de soporte, y la pieza de prueba que incluye el material reflector de luz se denota como una pieza de prueba del método divulgado en la presente descripción (Figura 4B).

En la almohadilla de muestra de la pieza de prueba, se depositaron 50 µl de un líquido con espécimen suspendido (Tris 10 mM (pH de 7.0), BSA al 3% y Triton X-100 al 0.2%). Después de dejar la mezcla resultante en reposo por 15 minutos, la porción inmovilizada con anticuerpo y la porción que circundaba la porción inmovilizada con anticuerpo en la pieza de prueba se irradiaron con luz de irradiación (LED verde) con un lector dedicado para inmunocromatografía y se midió la intensidad de la luz de detección reflejada por la pieza de prueba y las partículas de poliestireno coloreadas.

La Figura 9-1 muestra la relación de la posición en una pieza de prueba inmunocromatográfica y la intensidad de la luz reflejada en la posición. La figura 9-1 muestra el resultado de la pieza de prueba convencional y el resultado de la pieza de prueba del método divulgado en la presente descripción. La parte central donde la intensidad de la luz reflejada es baja (cerca de las posiciones 201 a 251) muestra una la porción en donde se acumulan las partículas de poliestireno coloreadas. Además, la Figura 9-2 es un gráfico que muestra un área de pico en la porción en donde la luz reflejada se atenúa debido a una influencia de las partículas de poliestireno coloreadas y la intensidad de la luz reflejada se reduce en la Figura 9-1. Como se muestra en la Figura 9-1, la intensidad de la luz reflejada emitida en la porción circundante y distinta de la porción en donde se acumulan las partículas de poliestireno coloreadas se amplificó claramente cuando se usó el método descrito en la presente invención cuando se comparó con el caso donde se utilizó una pieza de prueba convencional. Además, como se muestra en la Figura 9-2, el área del pico en la porción en donde la luz reflejada se atenúa debido a la influencia de las partículas de poliestireno coloreadas y la intensidad de la luz reflejada disminuye es mayor en el método divulgado en la presente descripción que en el método convencional. Los resultados muestran que la atenuación de la luz reflejada de la luz de irradiación se detecta más claramente debido a las partículas de poliestireno coloreadas.

Lista de signos de referencia

- a Banda de absorción
- b Membrana
- b' Porción de detección
- c Almohadilla conjugada
- d Almohadilla de muestra
- e Lámina de soporte
- f Material reflector
- g Lámina de soporte
- h Porción cortada

REIVINDICACIONES

1. Una pieza de prueba inmunocromatográfica, que comprende una membrana en donde se inmoviliza una sustancia de captura que es un ligando que se une a una sustancia por detectar,
5 en donde partículas portadoras insolubles a las cuales se une y se acumula un ligando que se une a la sustancia por detectar, se capturan con la sustancia de captura inmovilizada en la membrana;
10 la membrana es irradiada con luz para detectar la luz emitida en una porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles o una porción circundante y diferente a la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, midiendo así la sustancia por detectar; y
15 se proporciona un material reflector de luz en un lado de la membrana opuesto a un lado irradiado con luz, en donde la pieza de prueba inmunocromatográfica se almacena en un contenedor de almacenamiento y el contenedor de almacenamiento mismo está hecho del material reflector de luz.
2. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las partículas portadoras insolubles son partículas portadoras insolubles marcadas fluorescentes, y la membrana es irradiada con luz de excitación como luz de irradiación para detectar la fluorescencia emitida desde la porción donde se acumulan las
20 partículas portadoras insolubles, midiendo así la sustancia por detectar.
3. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las partículas portadoras insolubles son partículas portadoras insolubles coloreadas, y la membrana es irradiada con luz de radiación para detectar la luz reflejada, reflejada en la porción donde se acumulan las partículas portadoras insolubles y la porción
25 circundante y distinta de la porción en donde se acumulan las partículas portadoras insolubles, midiendo así la sustancia por detectar.
4. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se usa un material reflector de luz que tiene una reflectancia total de la luz de irradiación del 85% o más.
30
5. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una porción de adición de muestra, una banda de absorción y una porción marcada.
6. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde
35 el material reflector de luz es un material reflectante hecho de un metal.
7. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el metal es aluminio o cobre.
8. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la luz de irradiación de 250
40 nm a 1000 nm se usa cuando el metal es aluminio, y la luz de irradiación de 600 nm a 1000 nm se usa cuando el metal es cobre.
9. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el material reflector de luz tiene una estructura que recoge la luz de irradiación reflejada cerca de la porción de
45 detección de la pieza de prueba inmunocromatográfica.
10. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la sustancia por detectar, y el ligando que se une a la sustancia por detectar, son un antígeno y un anticuerpo respectivamente, o un anticuerpo y un antígeno respectivamente.
50

Fig. 1

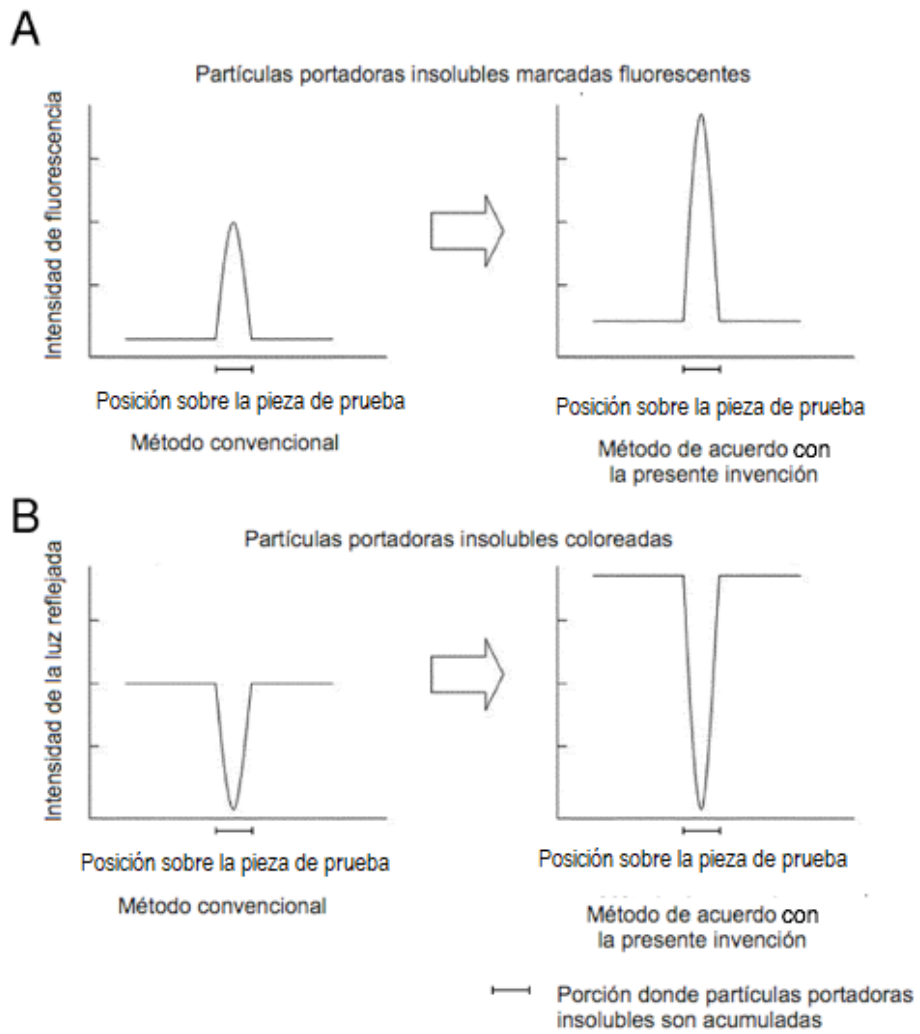
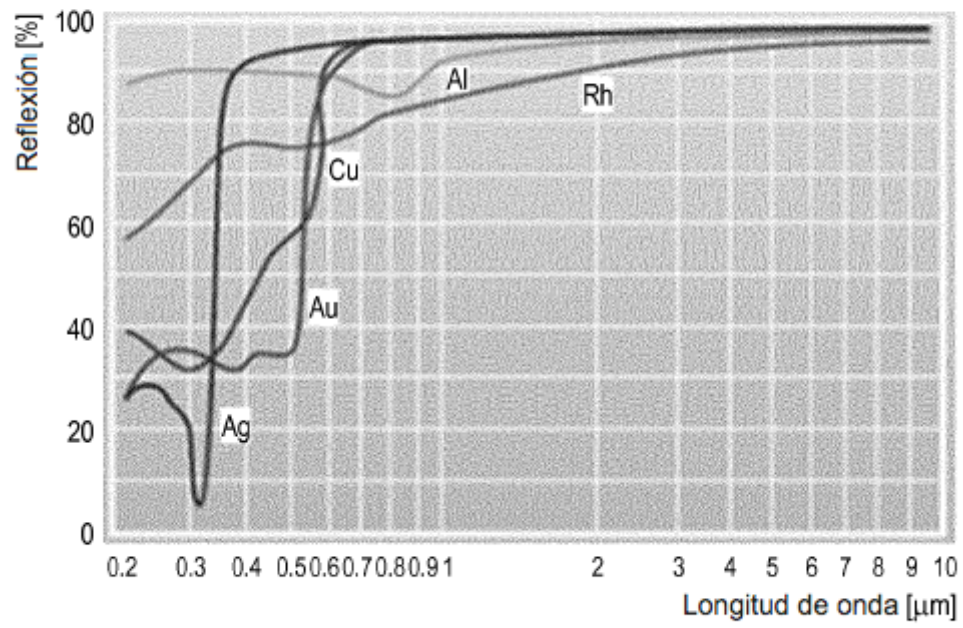


Fig. 2



A. McLeod "Thin film optical filters", A. Hilger, London, 1985

Fig. 3

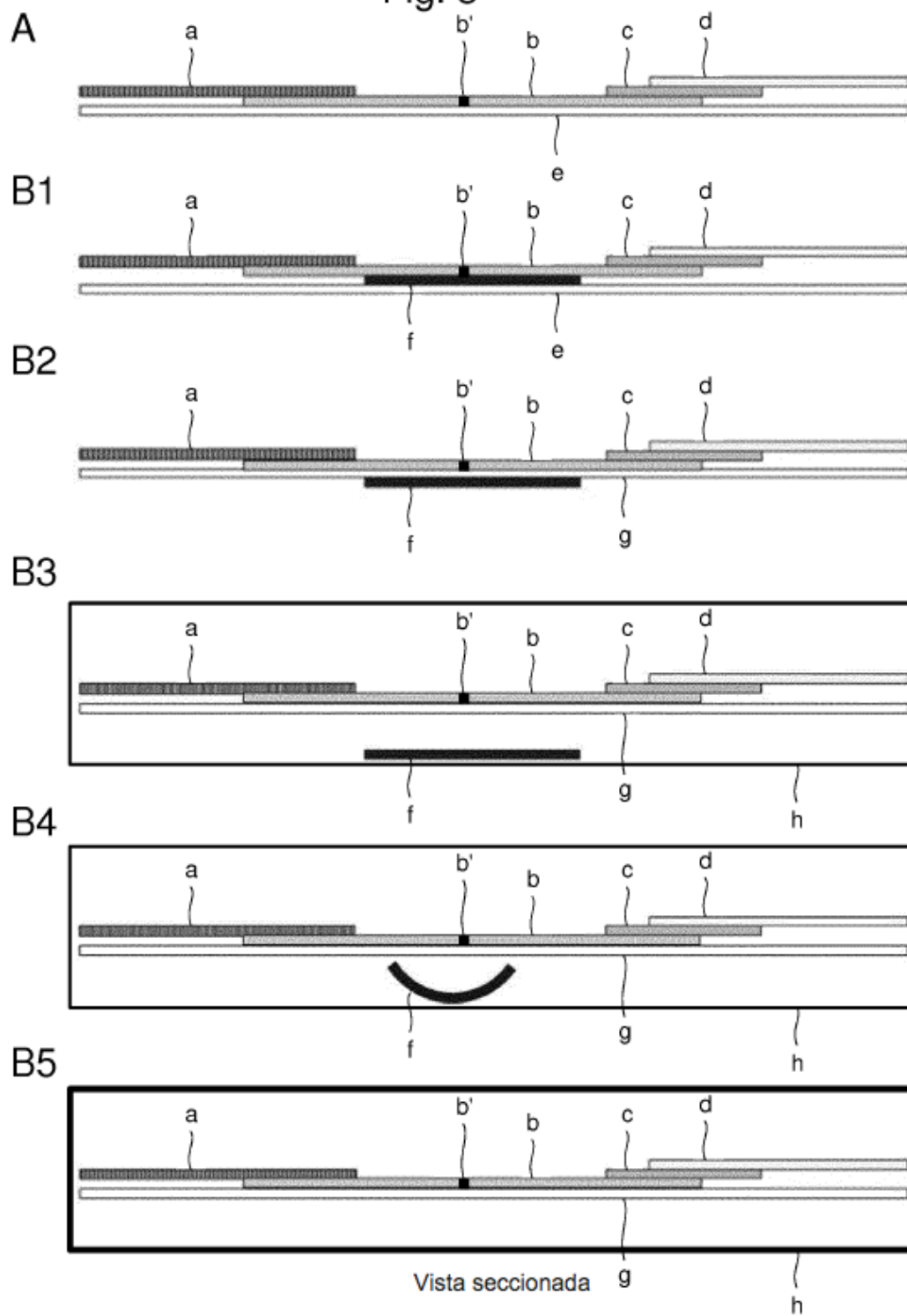


Fig. 4

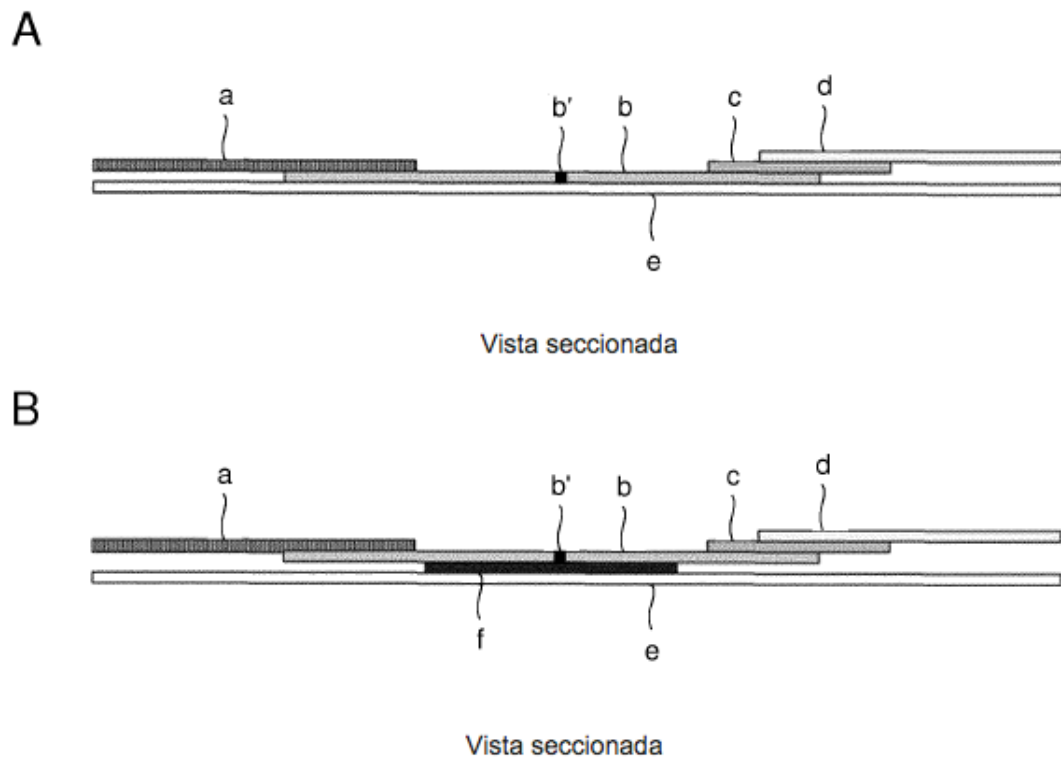


Fig. 5

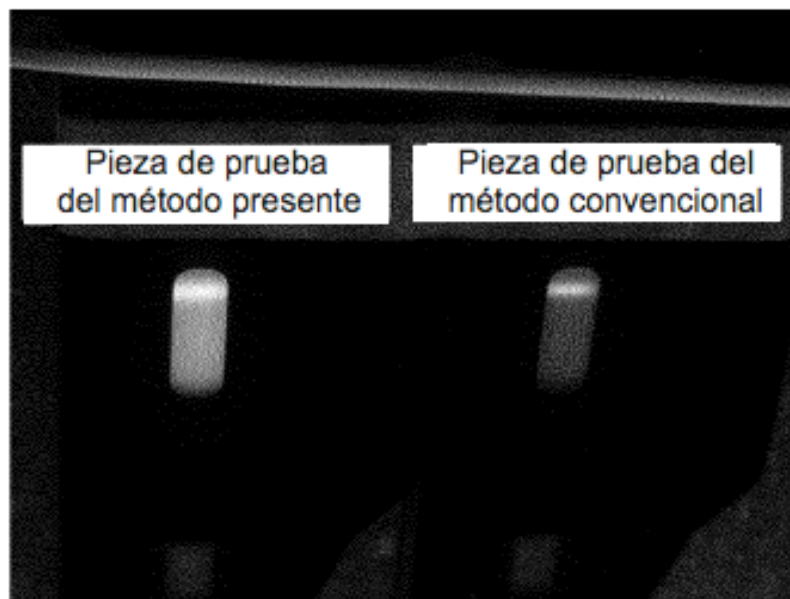
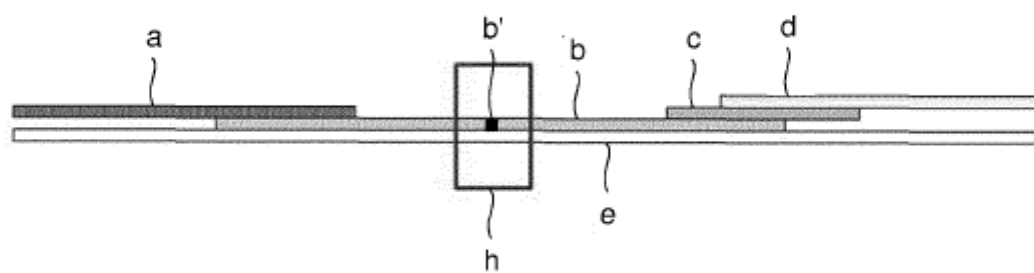


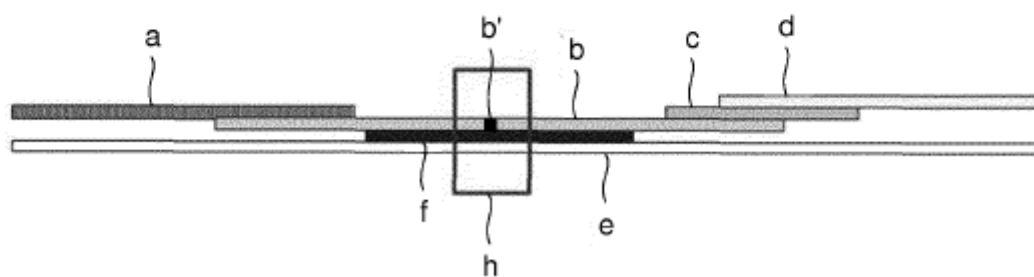
Fig. 6

A



Vista seccionada

B



Vista seccionada

Fig. 7

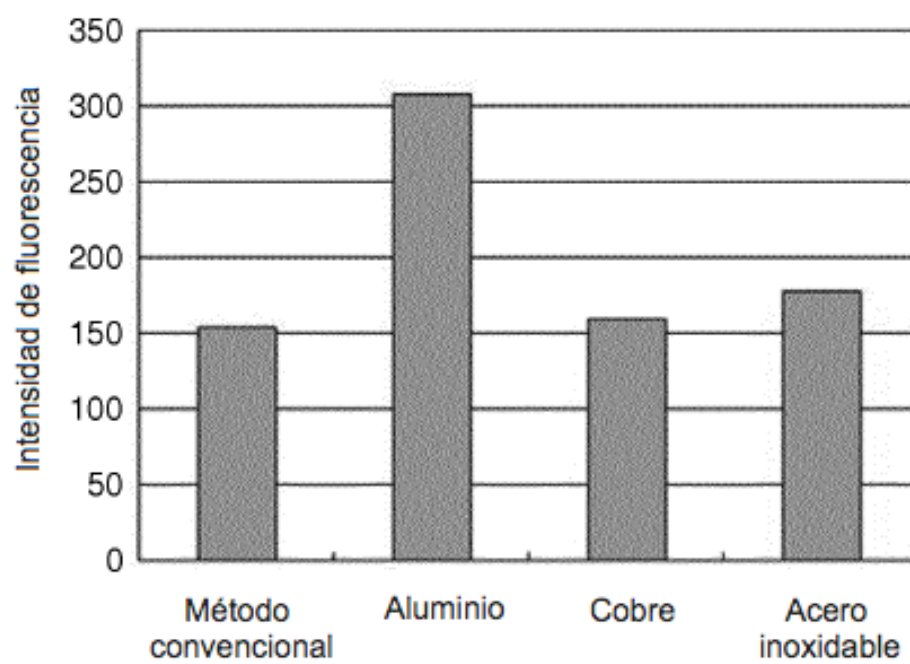


Fig. 8

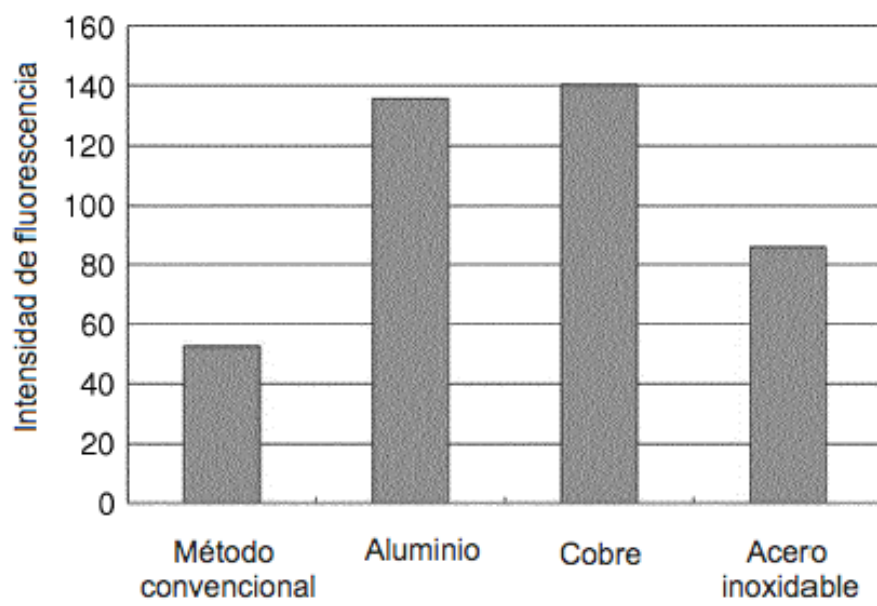


Fig. 9-1

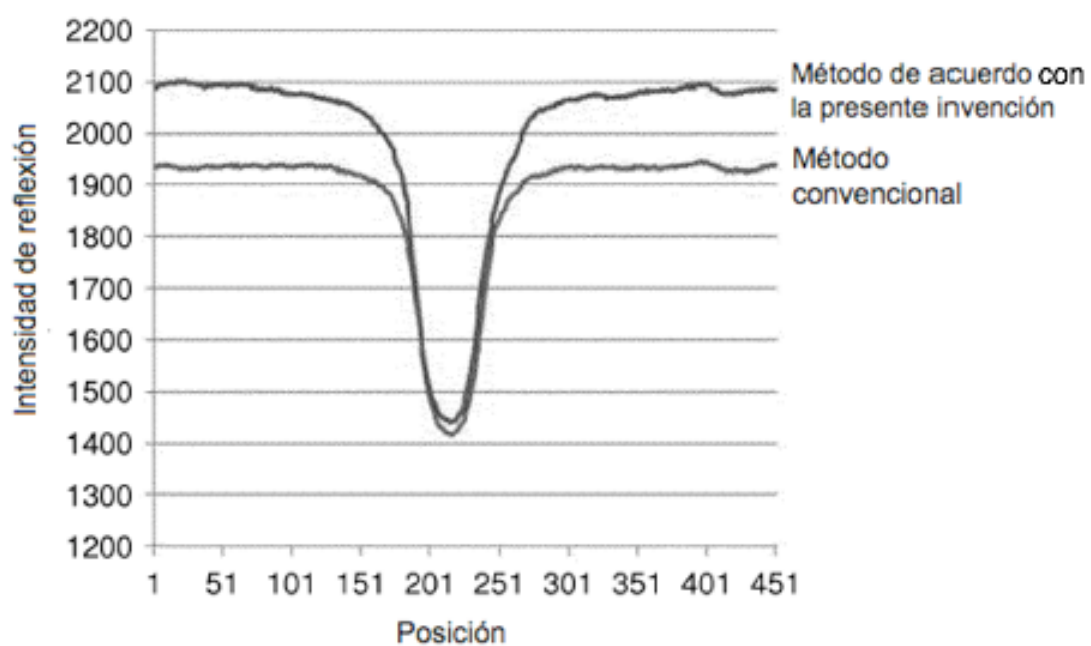


Fig. 9-2

