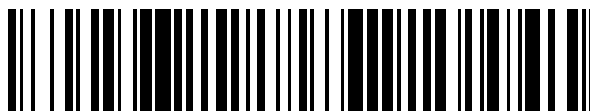


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 398**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2014 PCT/JP2014/052254**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14119725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2014 E 14745451 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2952896**

54 Título: **Procedimiento para reducir falsos negativos en inmunoensayo para ensayar muestra derivada de biomembrana**

30 Prioridad:

31.01.2013 JP 2013017134

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

03.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MIYAZAWA, TAKASHI y
SHINOHARA, YUKI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 711 398 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

Procedimiento para reducir falsos negativos en inmunoensayo para ensayar muestra derivada de biomembrana.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición de una solución para el tratamiento de una muestra para detectar exacta y específicamente una sustancia diana en una muestra en inmunoensayo utilizando una muestra derivada de una membrana mucosa biológica y un procedimiento de pretratamiento.

10

Técnica antecedente

15 Como un procedimiento para detectar una sustancia diana en una muestra derivada de un cuerpo vivo, se mencionan el inmunoensayo ligado a enzima, la inmunocromatografía y la turbidimetría de látex mediante un autoanalizador, por ejemplo. Como muestras que utilizar en estos procedimientos, se mencionan, por ejemplo: muestras de sangre, suero, esputo, saliva, hisopo de faringe, hisopo nasal, aspirado nasal e hisopo queratoconjuntival.

20 La mayoría de estas muestras, a excepción de la sangre y del suero, son derivados de membranas mucosas biológicas y contienen muchos componentes de defensa del huésped derivados del sistema inmunológico de la membrana mucosa. Es sabido que estos componentes son las causas de falsos positivos y de falsos negativos en la detección de sustancias diana mediante inmunoensayo (ver, por ejemplo, Bibliografía de Patentes 1).

25 Muchos procedimientos de diagnóstico rápido, basados principalmente en la inmunocromatografía, han sido ampliamente utilizados como un medio para detectar de manera rápida y sencilla enfermedades infecciosas causadas por virus o bacterias y para determinar una estrategia terapéutica.

30 La Bibliografía de Patentes 2 describe una composición de reactivos de inmunocromatografía. La Bibliografía de Patente 3 describe reactivos y procedimientos para la supresión de resultados de falsos positivos y de falsos negativos. La Bibliografía de Patentes 4 se refiere al problema de que los fluidos corporales presentan una amplia variedad de composiciones y enseña el tratamiento de una muestra con una poliamina a efectos de prevenir reacciones no específicas. La Bibliografía no Patente 1 se refiere a la influencia del pH sobre los anticuerpos que se ligan al ADN.

35 Los falsos positivos y falsos negativos resultantes de la utilización de procedimientos de diagnóstico rápidos basados principalmente en inmunocromatografía conducen a terapias erróneas, retardos en los tratamientos y a veces causan el fallecimiento de los pacientes. En particular, un falso negativo es un problema extremadamente significativo por cuanto interfiere con diagnósticos y terapias acertados.

40 Lista de referencias

Bibliografía de Patentes

45 Bibliografía de Patentes 1: Publicación de patente JP (Kokai) N.º 2009-52945
Bibliografía de Patentes 2: EP 2602619 A1
Bibliografía de Patentes 3: US 2004/0018556 A1
Bibliografía de Patentes 4: EP 0064274 A1
Bibliografía No de Patentes 1: Smeenk R. et al.; J. Immunol. Methods 55 (1982), páginas 361-373

50 Síntesis de la invención

Problema técnico

55 El problema por resolver consiste en la detección exacta y específica de una sustancia diana mediante la supresión de la acción de una sustancia inhibidora del inmunoensayo contenida en una muestra derivada de una membrana mucosa biológica.

Solución del problema

60 Los inventores de la presente han descubierto que es posible detectar de manera exacta y específica una sustancia diana mediante la adición de una molécula que tiene dos o más grupos sulfato a una solución para tratar una muestra derivada de una membrana mucosa biológica, y han llegado a la presente invención.

Más específicamente, la presente invención es como sigue:

65

[1] Un procedimiento para suprimir un falso negativo en un inmunoensayo para analizar una sustancia diana en una muestra derivada de una membrana mucosa biológica, en donde dicho procedimiento incluye tratar una muestra con una solución para el tratamiento de la muestra que contiene PIPES, que es un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato.

[2] El procedimiento de acuerdo con [1], en donde la muestra derivada de una membrana mucosa biológica es una muestra derivada de esputo, saliva, hisopo de faringe, hisopo nasal, aspirado nasal, hisopo queratoconjuntival y heces.

[3] El procedimiento de acuerdo con [1] o [2], en donde de acuerdo con la invención el compuesto que tiene dos o más grupos sulfato es PIPES (ácido piperazin-1,4-bis(2-etansulfónico) o un sulfato de dextrano que no es parte de la invención.

[4] También se describe que el sulfato de dextrano es sulfato de sulfato sódico que tiene un peso molecular medio de 5.000 a 500.000.

[5] El procedimiento de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que el compuesto que tiene dos o más grupos sulfato se halla contenido en una concentración del 0,1 al 2% (peso/volumen) en la solución para el tratamiento de la muestra.

[6] El procedimiento de acuerdo con cualquiera de [1] a [5], en el que el inmunoensayo es una inmunocromatografía.

La presente memoria descriptiva se refiere al contenido descrito en la memoria descriptiva y en los dibujos de la solicitud de patente japonesa N.º 2013-017134, sobre cuya base se reivindica la prioridad de la presente solicitud.

Efectos ventajosos de la invención

Es posible suprimir un falso negativo en un inmunoensayo en el que se utiliza una muestra derivada de una membrana mucosa biológica, mediante el tratamiento de la muestra derivada de una membrana mucosa biológica con una solución para el tratamiento de la muestra que contiene un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato, para la detección exacta de una sustancia diana.

Descripción de realizaciones

A continuación, se describe la presente invención más específicamente.

La presente invención se refiere a un procedimiento para analizar con exactitud una sustancia diana en un inmunoensayo impidiéndose al mismo tiempo un falso positivo y un falso negativo, en particular un falso negativo. En la presente, la expresión "falso positivo" se refiere al caso en el que en un ensayo se genera una señal indicativa de un positivo a pesar de que no hay una sustancia diana contenida en la muestra; mientras que la expresión "falso negativo" se refiere al caso en el que en un ensayo no se genera una señal indicativa de un positivo a pesar de que la sustancia diana contiene sustancia diana. Por ejemplo, en inmunocromatografía, si hay una sustancia diana presente en un muestra, sobre un sustrato en fase sólida se forma un complejo de una sustancia inmovilizada -una sustancia diana- un reactivo de marcación, y desde el complejo se emite una señal de un reactivo de marcación; sin embargo, en un falso negativo, la generación de una señal es inhibida, por ejemplo, por cuanto no se forma un complejo como el mencionado en lo que precede.

En el procedimiento de la presente invención, un sujeto que se va a analizar, es decir, la expresión "muestra derivada de una membrana mucosa biológica" (membrana mucosa), se refiere a una muestra contaminada con una sustancia derivada de una membrana mucosa biológica tal como una muestra derivada de una membrana mucosa de nasofaringe y una muestra derivada de una membrana mucosa de la cavidad oral. Los ejemplos específicos correspondientes pueden incluir muestras de esputo, saliva, hisopo de faringe, hisopo nasal, aspirado nasal, hisopo queratoconjuntival y heces. La muestra derivada de una membrana mucosa biológica contiene componentes de defensa del huésped tales como IgA que interviene en el sistema inmunológico de la membrana mucosa. Estos componentes son aquellos que inhiben las reacciones en los inmunoensayos y son causa de un falso positivo y un falso negativo.

En el procedimiento de la presente invención, un sujeto que se va a analizar, es decir, una sustancia diana, es decir, un antígeno o anticuerpo que puede ser analizado por inmunoensayo, más específicamente, un ensayo que utiliza una reacción antígeno-anticuerpo. Como antígeno puede utilizarse cualquier antígeno siempre y cuando pueda desarrollarse un anticuerpo. Los ejemplos de antígenos pueden incluir proteínas, polisacáridos y lípidos. Es posible detectar protozoos, hongos, bacterias, micoplasma, rickettsia, chlamydia, virus y otros que contengan estas sustancias.

Un sistema de ensayo para analizar con precisión una sustancia diana mientras se previene un falso positivo y un falso negativo, particularmente un falso negativo de acuerdo con el procedimiento de la invención, es un inmunoensayo en el que se utiliza una reacción de antígeno-anticuerpo que emplea un anticuerpo contra una sustancia diana (sujeto que se va a analizar) o empleando una unión de antígeno a un anticuerpo (sujeto que se va a analizar) para ser analizado. Los ejemplos de un sistema de análisis de este tipo pueden incluir ELISA, inmunocromatografía, un procedimiento de aglutinación, turbidimetría de látex mediante un autoanalizador,

transferencia Western e inmunotransferencia. De ellos, es preferible la inmunocromatografía sensible a una sustancia derivada de membrana mucosa.

5 En el procedimiento de la presente invención, una muestra derivada de una membrana mucosa biológica se trata previamente con PIPES, que es un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula. En la presente, el pretratamiento con un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula se puede realizar agregando una muestra tomado de una membrana mucosa biológica a una solución para el tratamiento de muestras que contiene un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula, seguido de mezclado. En la presente invención, un tratamiento en el que se agrega una solución de tratamiento de muestras (que sirve como una solución de pretratamiento) a una muestra derivada de una membrana mucosa biológica, seguido por mezclado para tratar una sustancia por analizar contenida en la muestra derivada de una membrana mucosa biológica con la solución para el tratamiento de la muestra se denomina "pretratamiento".

15 Como compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en la molécula, por ejemplo, se mencionan el PIPES (ácido piperazin-1,4-bis(2-etansulfónico)) y un sulfato de dextrano tal como sulfato de dextrano sódico (DSS, dextran sulfate sodium). PIPES es un compuesto representado por $C_8H_{18}N_2O_6S_2$ y que tiene dos grupos sulfato en una molécula. El sulfato de dextrano sódico es un compuesto representado por $(C_{11}H_{12}O_{28}S_6.6Na)_n$ y que tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 a 500.000 (peso molecular medio: de 1.600 a 500.000) aunque el peso molecular varía en función del grado de polimerización. Como sulfato de dextrano sódico, compuestos que tienen diversos pesos moleculares medios están disponibles comercialmente; por ejemplo, existen compuestos que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 1.600, un peso molecular medio de aproximadamente 5.000 (peso molecular: de 1.000 a 9.000), de 6.500 a 10.000, de 9.000 a 20.000, de aproximadamente 500.000. El número de grupos sulfato varía en función del peso molecular. Dado que el grado de sulfuración del sulfato de dextrano sódico es de casi el 100%, es posible calcular el número de grupos sulfato en base al peso molecular medio. Por ejemplo, el número de grupos sulfato de un compuesto sulfato de dextrano sódico que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5.000 (peso molecular: de 1.000 a 9.000) es de aproximadamente 30; el número de grupos sulfato en el caso de un peso molecular medio de 6.500 a 10.000 es de aproximadamente 55; el número de grupos sulfato en el caso de un peso molecular medio de 9.000 a 20.000 es de aproximadamente 94 y el número de grupos sulfato en el caso de un peso molecular medio de 500.000 es de aproximadamente 3253. Como compuesto descrito que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula, puede utilizarse un compuesto que tiene un peso molecular medio de 1.600 a 500.000 o un peso molecular medio de 5.000 a 500.000. A medida que aumenta el peso molecular del sulfato de dextrano sódico, un falso negativo se suprime de manera más eficaz aún en una baja concentración. Por esta razón, de entre los sulfatos de dextrano, es preferible el sulfato de dextrano sódico que tiene un peso molecular de 500.000.

35 En el pretratamiento de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, una solución para el tratamiento de muestras que contiene PIPES como un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula se añade a una muestra derivada de una membrana mucosa biológica como un aditivo para suspender la muestra en la solución para el tratamiento de la muestra. La solución para el tratamiento de la muestra puede contener, por ejemplo, un agente tensioactivo, BSA (bovine serum albumin, albúmina de suero bovino) y una sal, además del compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula, en un tampón. Los ejemplos del tampón pueden incluir, sin limitación, tampón de Tris (de aproximadamente pH 6 a 9) y tampón de fosfato. El agente tensioactivo no presenta limitaciones y puede utilizarse, por ejemplo, Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Pluronic, SDS (dodecilsulfato de sodio), que por lo general se usan en los inmunoensayos. Cabe observar que, en calidad de compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula, también puede utilizarse un compuesto que tiene una acción tamponante. Por ejemplo, el PIPES arriba mencionado es uno de los tampones buenos. Aun en este caso, es posible añadir un tampón tal como tampón de Tris como sustancia que tiene una acción tamponante.

50 La concentración de un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula en una solución para el tratamiento de muestras es del 0,1 al 2 % (peso/volumen), preferiblemente del 0,1 al 1 % (peso/volumen), más preferiblemente del 0,25 al 0,75 % (peso/volumen) y de una manera particularmente preferida, del 4 al 0,6 % (peso/volumen).

55 Por ejemplo, es posible añadir una muestra como las mencionadas en lo anterior a una solución para el tratamiento de muestras de varios centenares de μL , preferiblemente de 200 a 800 μL , y se somete a una buena agitación para suspender la muestra. Por ejemplo, en el caso en que la muestra sea saliva, es posible impregnar con saliva un hisopo de algodón para tomar muestras de una muestra, embebido en una solución para el tratamiento de muestras para suspender la muestra. En el caso en el que la muestra sea un hisopo de faringe, es posible tomar membrana mucosa de faringe mediante un hisopo de algodón, después lo cual se embebe el hisopo de algodón en una solución para el tratamiento de muestras, para suspender la muestra.

60 Una muestra derivada de una membrana mucosa biológica se suspende en una solución para el tratamiento de muestras, y la solución para el tratamiento de la muestra que tiene la muestra suspendido en ella, se somete como una muestra de ensayo a un sistema de análisis, utilizando una reacción de antígeno-anticuerpo para analizar una sustancia diana. Después de haber mezclado una muestra con una solución para el tratamiento de muestras y de haberlo sometido a una agitación intensa para ponerlo en suspensión, la muestra de ensayo resultante se puede

utilizar de inmediato en un ensayo. Por ejemplo, en la inmunocromatografía, una sustancia capaz de unirse a una sustancia diana, tal como un anticuerpo, se inmoviliza sobre un sustrato de fase sólida adecuada tal como una membrana de nitrocelulosa; se permite que migre un complejo de sustancia diana con una sustancia capaz de ligarse a una sustancia diana y marcarse con una sustancia de marcación adecuada (reactivo de marcación) tal como partículas de poliestireno coloreadas y con oro coloidal, y que se desarrolle sobre el sustrato de fase sólida por medio de un fenómeno capilar. Como resultado de ello, sobre el sustrato de fase sólida se forma un complejo de la sustancia inmovilizada (la sustancia diana) el reactivo de marcación. La sustancia diana puede detectarse mediante la detección de una señal del reactivo de marcación emitida desde el complejo (en el caso del oro coloidal, una porción del sustrato de fase sólida con la que se liga una sustancia capaz de unirse a una sustancia diana, toma un color rojo).

Se lleva a cabo el inmunoensayo a una temperatura de 5 a 35 °C, preferentemente a temperatura ambiente. Es posible llevar a cabo un tratamiento de una muestra derivada de una membrana mucosa biológica con una solución para el tratamiento de muestras, a una temperatura dentro de este intervalo de temperaturas. La presente invención también abarca una solución para el tratamiento de muestras, que contiene un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato en una molécula, para suprimir un falso negativo en inmunoensayos para una muestra derivada de una membrana mucosa biológica. La presente invención comprende, además, un kit de inmunoensayo que contiene la solución para el tratamiento de la muestra para suprimir un falso negativo en los inmunoensayos para analizar una muestra derivada de una membrana mucosa biológica. El kit de inmunoensayo contiene, por ejemplo, un dispositivo de inmunocromatografía que contiene, por ejemplo, un reactivo para inmunocromatografía.

EJEMPLOS

La presente invención se describirá más específicamente mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos.

Ejemplo de preparación

1. Preparación de anticuerpo monoclonal NP virus anti-influenza B

Un ratón BALB/c fue inmunizado con un antígeno del virus de influenza B, y se le crio durante un tiempo predeterminado. Se extirpó el bazo del ratón y las células esplénicas fueron fusionadas con células de mieloma de ratón (P3 x 63) de acuerdo con el procedimiento de Kohler (Kohler et al., Nature, vol, 256, p495-497 (1975)). Las células de hibridoma resultantes se mantuvieron en una incubadora a 37 °C. Mientras se verificaba la actividad de anticuerpo del sobrenadante mediante ELISA –para lo cual se utilizó una placa sobre la cual se inmovilizó un antígeno NP del virus de influenza B-, fueron purificadas las células (monoclonadas). Se obtuvieron dos cepas de células y se administraron por separado por vía intraperitoneal a ratones BALB/c tratados con pristano. Aproximadamente dos semanas después, se recolectaron los fluidos ascíticos que contenían el anticuerpo.

Se purificó la IgG de cada uno de los fluidos ascíticos obtenidos por cromatografía por afinidad para lo cual se utilizó una columna de proteína A de manera obtener dos tipos de anticuerpos NP de virus anti-influenza B.

2. Inmovilización del anticuerpo del virus anti-influenza B sobre una membrana de nitrocelulosa

El anticuerpo NP de virus anti-influenza B purificado se diluyó con agua purificada para obtener una concentración de 1,0 mg/mL. La solución diluida se aplicó linealmente a una posición predeterminada sobre una membrana de nitrocelulosa con un respaldo consistente en una película de PET. La membrana de nitrocelulosa se secó a 45 °C durante 30 minutos para obtener una membrana inmovilizada de anticuerpo NP de virus anti-influenza B (denominada en más en la presente, membrana inmovilizada de anticuerpo).

3. Inmovilización del anticuerpo de virus anti-influenza B sobre partículas de poliestireno coloreadas

Otro anticuerpo NP de virus anti-influenza B, que no fue utilizado para su inmovilización sobre una membrana de celulosa, se diluyó con agua purificada para obtener una concentración de 1,0 g mg/mL. A esto se añadieron partículas de poliestireno coloreadas (fabricadas por Thermo scientific) para obtener una concentración del 0,1 % (peso/volumen). Después de la agitación, se añadió carbodimida a la mezcla para obtener una concentración del 1% (peso/volumen), y luego se agitó. El sobrenadante se retiró por centrifugación y el pellet se resuspendió en 50 mM de Tris (pH 9,0) y BSA al 3% (peso/volumen) para obtener partículas de poliestireno coloreadas ligadas a anticuerpo NP de virus anti-influenza B.

4. Recubrimiento con partículas de poliestireno coloreadas ligadas a anticuerpo NP de virus anti-influenza B, seguido de secado

Las partículas de poliestireno coloreadas ligadas a anticuerpo NP de virus anti-influenza B obtenidas en el Capítulo 3, se aplicaron a un paño no tejido de fibras de vidrio en una cantidad determinada de 1,0 µg y se secaron a 45 °C durante 30 minutos.

5. Adhesión de la membrana de inmovilización a almohadilla seca y a otros miembros

Cada una de las membranas de anticuerpo inmovilizado preparadas en las secciones 2 y 4, se adhirió a una almohadilla seca y a otros miembros (lámina de respaldo, banda de absorción (almohadilla de muestra)), se cortó en pedazos con un ancho de 5 mm, y se usó como tiras de ensayo para el virus de influenza B.

6. Preparación de anticuerpo monoclonal NP de virus anti-influenza A

Un ratón BALB/c se inmunizó con un antígeno del virus de influenza A, y se lo crió durante un tiempo predeterminado. Se extirpó el bazo del ratón y las células esplénicas fueron fusionadas con células de mieloma de ratón (P3 x 63) de acuerdo con el procedimiento de Kohler (Kohler et al., Nature, vol, 256, p495-497 (1975)). Las células de hibridoma resultantes se mantuvieron en una incubadora a 37 °C. Mientras se verificaba la actividad de anticuerpo del sobrenadante mediante ELISA –para lo cual se utilizó una placa sobre la cual estaba inmovilizado un antígeno NP del virus de influenza A-, se purificaron las células (monoclonadas). Se obtuvieron dos cepas de células y se las administró por separado por vía intraperitoneal a ratones BALB/c tratados con pristano. Aproximadamente dos semanas después, se recolectaron los fluidos ascíticos que contenían el anticuerpo.

Se purificó la IgG de cada uno de los fluidos ascíticos obtenidos mediante cromatografía por afinidad, para lo cual se utilizó una columna de proteína A de manera obtener dos tipos de anticuerpos NP de virus anti-influenza A.

7. Inmovilización del anticuerpo de virus anti-influenza A sobre una membrana de nitrocelulosa

El anticuerpo NP de virus anti-influenza A purificado se diluyó con agua purificada para obtener una concentración de 1,0 mg/mL. La solución diluida se aplicó linealmente a una posición predeterminada sobre una membrana de nitrocelulosa con un respaldo de película de PET. La membrana de nitrocelulosa se secó a 45 °C durante 30 minutos, obteniendo una membrana de anticuerpo inmovilizado NP de virus anti-influenza A (denominada en más en la presente, membrana de anticuerpo inmovilizado).

8. Inmovilización del anticuerpo de virus anti-influenza A sobre partículas de poliestireno coloreadas

Otro anticuerpo NP de virus anti-influenza B, que no fue utilizado para su inmovilización sobre una membrana de celulosa, fue diluido con agua purificada para obtener una concentración de 1,0 g mg/mL. A esto se añadieron partículas de poliestireno coloreadas para obtener una concentración del 0,1 % (peso/volumen). Después de la agitación, se añadió carbodimida a la mezcla para obtener una concentración del 1% (peso/volumen), y se siguió agitando. El sobrenadante se retiró por centrifugación y el pellet se resuspendió en una solución que contenía 50 mM de Tris (pH 9,0) y BSA al 3% (peso/volumen) para obtener partículas de poliestireno coloreadas ligadas a anticuerpo NP de virus anti-influenza A.

9. Recubrimiento con partículas de poliestireno coloreadas ligadas a anticuerpo NP de virus anti-influenza A, seguido por secado

Las partículas de poliestireno coloreadas ligadas a anticuerpo NP de virus anti-influenza A obtenidas en el Capítulo 8 se aplicaron a un paño no tejido de fibras de vidrio en una cantidad determinada de 1,0 µg y se secaron a 45 °C durante 30 minutos.

10. Adhesión de la membrana de inmovilización a almohadilla seca y a otros miembros

Cada una de las membranas de anticuerpo inmovilizado preparadas en las Secciones 7 y 9 se adhirió a una almohadilla seca y a otros miembros tales como una lámina de respaldo, una banda de absorción y una almohadilla de muestra, se cortó en pedazos con un ancho de 5 mm, y se usó como tiras de ensayo para el virus de influenza A.

Ejemplo 1. Verificación del efecto de supresión de falso negativo debido a muestra de saliva en la inmunocromatografía para la detección del antígeno del virus de influenza B.

Se utilizaron 10 mM de Tris (pH 7,0), BSA al 3 % (peso/volumen) y Triton X-100 al 0,2 % (peso/volumen) como una solución de control para el tratamiento de muestras. Se prepararon soluciones para el tratamiento de muestras que tenían diferentes composiciones para verificar aditivos que tienen grupo sulfato, más específicamente, MES, que es un tampón que tiene un único grupo sulfato por molécula y PIPES, que es un tampón que tiene dos grupos sulfato: tensioactivos aniónicos, más específicamente dodecilsulfato de sodio (designado en la presente como SDS, un grupo de sulfato/molécula individual) y desoxicolato de sodio (designado en lo que sigue como DOC, sin grupo sulfato/molécula); polímeros aniónicos, más específicamente poliacrilato de sodio (designado en lo que sigue como SPA, sin grupo sulfato/molécula), sulfato de dextrano sódico (designado en lo que sigue como DSS, el número de grupos sulfato varía en función del peso molecular del dextrano) y dextrano (designado en lo que sigue como DEX, sin grupo sulfato/molécula), que se utilizó como control para sulfato de dextrano sódico (ver la Tabla 1 para detalles). El aditivo que tiene un grupo sulfato se añadió a un tampón para obtener una concentración del 0,5% (en

peso/volumen). Los compuestos de sulfato de dextrano sódico utilizados en solución para el tratamiento de muestras N.º 6 a 9 de la tabla 1 se obtuvieron de SIGMA (catálogos N.º D8906, D6921, D4911 y D7037, respectivamente).

5 Se insertó un hisopo de algodón (Ex swab-001; fabricado por Denka Seiken Co., Ltd.) en una boca, y se impregnó suficientemente con saliva. La saliva fue suspendida en cada una de las soluciones para el tratamiento de las muestras (400 µL) que tienen diferentes composiciones. A la solución de suspensión, se añadió virus de influenza B desactivado (30 µL), y se mezcló. La mezcla de solución resultante (50 µL) se añadió gota a gota sobre las almohadillas de muestra de las tiras de ensayo del virus de influenza B. Diez minutos después, se llevó a cabo la determinación en forma visual. Un resultado en el que se observó una señal en una línea de ensayo de tipo B fue evaluado como "+", un resultado en el que la señal era manifiestamente débil se evaluó como "+ débil", un resultado en el que no se efectuó fácilmente la determinación de una señal se evaluó como "±", y un resultado en el que no se observó ninguna señal se evaluó como "-". Simultáneamente, se sometieron a ensayo soluciones para el tratamiento de muestras que no contenían nada de saliva. Se verificarán los efectos de las composiciones de las soluciones de tratamiento sobre el sistema de la reacción.

15

[Tabla 1]

Composición de la solución para el tratamiento de muestras y número de grupos sulfato por molécula por verificar			
Solución para el tratamiento de muestras N.º	Composición de la solución para el tratamiento de muestras	Peso molecular medio la molécula por verificar	Número de grupos sulfato por molécula por verificar
Control	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100	-	Ninguno
1	10 mM de MES (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100	213,25	1
2	10 mM de PIPES (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100	353,36	2
3	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de SDS	288,38	1
4	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de DOC	-	0
5	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de SPA (poliacrilato de sodio)	-	0
6	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de DSS	500.000	Aproximadamente 3253
7	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de DSS	9.000- 20.000	Aproximadamente 94
8	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de DSS	6.500- 10.000	Aproximadamente 55
9	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de DSS	5.000	Aproximadamente 30
10	10 mM de Tris (pH 7,0), 3% de BSA, 0,2% de Triton X-100, 0,5% de DEX	15000- 20000	0

20 Como resultado, el número de resultados falsos negativos se incrementó mediante la adición de saliva. En cambio, MES y PIPES, que son tampones que tienen uno o más grupos sulfato, suprimieron el incremento de los resultados falsos negativos. En particular, el efecto de PIPES con dos grupos sulfatos era elevado (de acuerdo con la invención). En el sistema de los tensioactivos aniónicos en los que no se añadió saliva, se halló que la reacción tiende a inhibirse, mientras que el número de falsos negativos se reducía ligeramente en el sistema que contenía SDS, pero se observó una significativa disminución de la sensibilidad. Había una posibilidad de que estos agentes tensioactivos ya hubieran retirado el anticuerpo inmovilizado sobre la membrana de nitrocelulosa o desnaturalizaron un antígeno del virus de influenza B o anticuerpo NP de virus anti-influenza B mediante los efectos de desnaturalización que tenían. En los polímeros aniónicos, no se produjo ningún efecto mediante un poliacrilato de

25

sodio que tiene un grupo carboxilo; en cambio, puede suprimirse casi por completo el incremento de los falsos negativos mediante el sulfato de dextrano sódico que tenía grupos sulfato. No se produjo ningún efecto por el dextrano que servía como un control para el sulfato de dextrano sódico.

5 De los resultados anteriores, se demostró que es posible suprimir un incremento de falsos negativos por una muestra de saliva mediante la adición de una molécula que tiene dos o más grupos sulfato a una solución de tratamiento. Aunque aquí no se muestren los datos, a medida que aumenta el peso molecular del sulfato de dextrano sódico, es posible suprimir los falsos negativos aún en una baja concentración, y fue necesario utilizar un sulfato de dextrano sódico de bajo peso molecular, en una elevada concentración. Por esta razón, durante y
10 después del Ejemplo 2, se llevó a cabo la verificación mediante la utilización de sulfato de dextrano sódico que tenía un peso molecular medio de 500.000.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

15

[Tabla 2]

Efecto supresor de moléculas que tienen un grupo sulfato sobre el falso negativo debido al muestra de saliva (virus de influenza B)		
Solución para el tratamiento de muestras N.º	Sin saliva	Con saliva
Control	+	-
1	+	±
2	+	+débil
3	±	±*
4	+	-
5	+	-
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	-
*Más débil que una muestra sin saliva		

Ejemplo 2 (no de acuerdo con la invención). Verificación del efecto de supresión sobre el falso negativo debido a una muestra de saliva en inmunocromatografía para la detección de antígenos del virus de influenza A.

20 El efecto supresor sobre falso negativo debido a la presencia de saliva en la inmunocromatografía para la detección del antígeno del virus de influenza A fue verificado utilizando la solución para el tratamiento de muestras N.º 6, que mostró el efecto más elevado en el Ejemplo 1.

25 Se insertó un hisopo de algodón (Ex swab-001; fabricado por Denka Seiken Co., Ltd.) en una boca, y se impregnó suficientemente con saliva. La saliva se suspendió en cada una de las soluciones para el tratamiento de las muestras (400 µL) que tienen diferentes composiciones. A la solución de la solución, se añadió virus de influenza B desactivado (30 µL), y se mezcló. La mezcla de solución resultante (50 µL) se añadió gota a gota sobre las almohadillas de muestra de las tiras de ensayo del virus de influenza A. Diez minutos después, se llevó a cabo la
30 determinación en forma visual.

Como resultado, los falsos negativos debidos a la saliva fueron exitosamente suprimidos mediante la utilización de la solución para el tratamiento de las muestras N.º 6, como en el Ejemplo 1 (resumido en la Tabla 3).

[Tabla 3]

Efecto supresor de moléculas que tienen grupos sulfato sobre falso negativo debido al muestra de saliva (virus de influenza A)		
Solución para el tratamiento de muestras N.º	Sin saliva	Con saliva
Control	+	-
6	+	+

Ejemplo 3 (no de acuerdo con la invención) Verificación del efecto de supresión sobre falso negativo debido a una muestra de hisopo nasofaríngeo en la inmunocromatografía para la detección de antígenos de los virus de influenza A y B.

5 El efecto supresor sobre los falsos negativos debidos a la muestra de hisopo nasofaríngeo en la inmunocromatografía para la detección del antígeno de los virus de influenza A y B fue verificado utilizando la solución para el tratamiento de muestras N.º 6, que mostró el efecto más elevado en el Ejemplo 1.

10 Se recolectaron muestras de hisopo nasofaríngeo mediante la utilización de un hisopo de algodón (Ex swab-002, fabricado por Denka Seiken Co., Ltd.) y se suspendieron en cada una de las soluciones para el tratamiento de muestras (400 µL), que tenían diferentes composiciones. A la solución de la suspensión, se añadieron virus de influenza A desactivado o virus de influenza B desactivado (30 µL), y se mezclaron. La mezcla de solución resultante (50 µL) se añadió gota a gota sobre las almohadillas de cada una de las tiras de ensayo. Diez minutos después, se llevó a cabo la determinación visualmente.

15 Como resultado, los falsos negativos debidos a la muestra de hisopo nasofaríngeo fueron exitosamente suprimidos mediante la utilización de la solución para el tratamiento de las muestras N.º 6, como en los Ejemplos 1 y 2 (resumido en la Tabla 4).

20 [Tabla 4]

Efectos supresores de las moléculas que tienen uno o más grupos sulfato sobre falso negativos debido a la muestra de hisopo nasofaríngeo (virus de influenza A o virus de influenza B)				
Solución para el tratamiento de muestras N.º	Virus de influenza A sin hisopo nasofaríngeo	Virus de influenza A con hisopo nasofaríngeo	Virus de influenza B sin hisopo nasofaríngeo	Virus de influenza B con hisopo nasofaríngeo
Control	+	-	+	-
6	+	+	+	+

25 De los resultados anteriores, se descubrió que los falsos negativos en los inmunoensayos debidos a muestras derivados de membrana mucosa nasofaríngea y de una muestra de saliva (una muestra derivada de la membrana mucosa de la cavidad oral) pueden suprimirse mediante la utilización de la solución para el tratamiento de muestras que contiene una molécula que tiene un grupo sulfato (en particular, un polímero que tienen dos o más grupos sulfato).

Aplicabilidad industrial

30 La presente invención permitió construir un sistema de inmunoensayos que puede proporcionar análisis exactos, suprimiéndose al mismo tiempo un falso negativo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para suprimir un falso negativo en un inmunoensayo para analizar una sustancia diana en una muestra derivada de una membrana mucosa biológica, en donde dicho procedimiento comprende el tratamiento de una muestra con una solución para el tratamiento de muestras que contiene PIPES (ácido piperazin-1,4-bis(2-etansulfónico) que es un compuesto que tiene dos o más sulfatos.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la muestra derivada de una membrana mucosa biológica es una muestra seleccionado de entre hisopos de esputo, saliva, hisopo faríngeo, hisopo nasal, aspirado nasal, hisopo queratoconjuntival y heces.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación de 1 o 2, donde PIPES (ácido piperazin-1,4-bis(2-etansulfónico)) está comprendido en una concentración del 0,1 al 2 % (peso/volumen) en la solución para el tratamiento de la muestra.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inmunoensayo es una inmunocromatografía.