



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 011**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04745332 .9**
96 Fecha de presentación : **26.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1637883**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Procedimiento inmunocromatográfico.**

30 Prioridad: **27.05.2003 JP 2003-149638**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.03.2010

73 Titular/es: **Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.**
13-1, Nishi-Goken-cho
Shinjuku-ku, Tokyo 162-0812, JP

72 Inventor/es: **Ono, Tetsuya;**
Fujii, Takayuki;
Sugiyama, Kazuyuki;
Kuroda, Takashi y
Kawamura, Masahide

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 335 011 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 inmunocromatográfico.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento inmunocromatográfico.

Antecedentes de la técnica

10 Se han desarrollado diversos productos para inmunocromatografía, en los cuales la sangre puede usarse como una muestra a ensayar, pero cuando la sangre entera se revela sin un tratamiento previo sobre una tira o membrana inmunocromatográfica, el revelado inmunocromatográfico generalmente no funciona bien. Para evitar este problema, debería separarse un suero o plasma de la sangre entera con el fin de separar las células de sangre o similares. La
15 centrifugación es un procedimiento principal de separación de plasma/suero. Sin embargo, dado que se requiere una centrifuga para la centrifugación, un médico de medicina general no realiza usualmente la centrifugación en una sala de consulta. Es conocido un procedimiento que usa un filtro, tal como un filtro de plasma (Fuji Film), como otro procedimiento para la separación del plasma, pero igualmente necesita tiempo y es costoso. Además, es necesaria una gran cantidad de sangre entera, puesto que debería ampliarse un área de filtración del filtro de plasma con el fin de
20 separar una cantidad suficiente de plasma sin hemolisis y obstrucción.

Bajo estas circunstancias, se han desarrollado algunos procedimientos en los cuales se ha situado un relleno para una separación de plasma/suero sobre una tira inmunocromatográfica. Más particularmente, el relleno de separación está situado sobre una porción para recibir una muestra de sangre entera en la tira inmunocromatográfica. Cuando se
25 aplica la muestra de sangre entera a la porción receptora, las células de sangre se mantienen en el relleno de separación, de manera tal que no se mueven de la tira inmunocromatográfica durante un tiempo corto, en tanto que en ese tiempo solamente se revelan los componentes del suero sobre la tira inmunocromatográfica.

Los procedimientos anteriores que tienen un relleno de este tipo, comprenden otros diversos dispositivos para
30 prevenir que los eritrocitos de la sangre entera se hemolizen y se separen los componentes del suero de las células de sangre sin hemolisis. Más particularmente, existen muchas solicitudes de patentes y patentes registradas, por ejemplo, la Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) No. 2002-214236 [referencia de patente 1], que usa una membrana de carboximetilcelulosa como una membrana para capturar células de sangre, la Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) No. 2002-350428 [referencia de patente 2], que usa propanol y/o acrilamida, o la
35 Patente Japonesa No. 2940990 [referencia de patente 3], que usa una sustancia porosa sinterizada hidrófila. Los procedimientos divulgados en estas referencias de patentes se caracterizan por evitar la hemolisis. Esto es debido a que la hemolisis colorea de rojo la membrana entera de revelado inmunocromatográfico, incluyendo una zona para enjuiciamiento, y como un resultado de ello el enjuiciamiento se vuelve muy difícil.

40 Shiff (*Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 87, (nº. 6), págs. 646-8, (1993)), divulga la detección inmunocromatográfica de una proteína marcadora para *Plasmodium faicparum* en la sangre de pacientes infectados. En ella, se usa un ensayo denominado ensayo ParaSight®-F y se usa el detergente anfólico Zwittergent® 3-14 para hemolizar de la sangre antes de la detección inmunocromatográfica.

45 En campos distintos del procedimiento inmunocromatográfico, son conocidos un procedimiento de medición hemolítico [referencia de patente 4] o un reactivo para hemolizar la sangre entera con un detergente o similar (Celltac Chemi; Nihon Kohden Corporation). Estos sistemas de ensayo conocidos no tienen dicho problema, dado que los pigmentos rojos no afectan la medición.

50 Sin embargo, en reactivos para inmunocromatografía, en los cuales se usan un agente de revelado o de coloración y se realiza un juicio visual, tal como una inmunocromatografía de coloide de oro caracterizada por el teñido con rojo, el teñido con pigmentos rojos causados por la hemolisis es un problema crucial. Con el fin de evitar la hemolisis o un reventamiento de eritrocitos, las células de sangre se mantienen en el relleno para la separación del plasma bajo condiciones suaves y, de esta forma, transcurre algún tiempo antes de que comience el revelado inmunocromatográfico. Además, una cantidad del plasma revelado está afectado por la viscosidad de una muestra de sangre entera y, en
55 consecuencia, frecuentemente se pierde cuantitividad. Además, frecuentemente existen cambios importantes de velocidad de separación y elución del plasma, dependiendo de la influencia de la matriz, tal como la viscosidad de una muestra de sangre entera. Por esta razón, existe disponible un aparato (Roche), en el cual se compensa una intensidad de color en base a un tiempo de revelado a partir de la separación del plasma por el relleno para colorear la separación
60 del plasma (no a partir del suministro de una muestra de sangre entera).

Además, es técnicamente difícil mantener completamente las células de sangre sobre el relleno para la separación del plasma durante un tiempo largo, y algunas células de sangre alcanzan la membrana de revelado inmunocromatográfico. En un caso, tal como una inmunocromatografía de enzima, en el cual debería revelarse además una segunda
65 solución de revelado, tal como una solución de lavado o una solución de sustrato de enzima, después del revelado inmunocromatográfico de una muestra, las células de sangre que se escapan fuera del relleno para la separación del plasma y alcanzan la membrana de revelado inmunocromatográfico, inhiben un revelado de la segunda solución. Como un resultado de ello, no puede obtenerse un valor medido exacto mediante una inmunocromatografía de este tipo.

Además, como un caso especial, se conoce un reactivo [referencia de patente 5] para la medición de un antígeno sobre la superficie de eritrocitos mediante inmunocromatografía. En el ensayo, se usa una membrana de revelado inmunocromatográfico que tiene un tamaño de poro extremadamente grande (5 a 100 μm), y se lleva a cabo una etapa de revelado sobre la membrana sin un reventamiento de los eritrocitos. El ensayo se caracteriza porque los eritrocitos no revientan, así como por los procedimientos inmunocromatográficos convencionales anteriormente mencionados.

Las características importantes de un procedimiento inmunocromatográfico son conveniencia, rapidez, y bajo coste. Dichas ventajas se pierden en los procedimientos anteriores que usan una centrifuga, los cuales precisan tiempo y esfuerzo, o el uso de un filtro previo costoso para la separación del plasma. El problema se supera en los procedimientos anteriores en los cuales el relleno para la separación del plasma está localizado sobre la tira inmunocromatográfica, pero la rapidez o reproducibilidad de la misma debería mejorarse. Además, es difícil usar el relleno en un caso (por ejemplo, una inmunocromatografía de enzima) en el cual debería revelarse otro líquido después del revelado de una muestra a ensayar.

[referencia de patente 1] Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) No. 2002-214236.

[referencia de patente 2] Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) No. 2002-350428.

[referencia de patente 3] Patente Japonesa No. 2940990.

[referencia de patente 4] Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) No. 10-221334.

[referencia de patente 5] Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) No. 2000-111555.

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

Tal como se ha descrito anteriormente, en los procedimientos inmunocromatográficos convencionales que usan sangre (es decir, sangre entera) como una muestra, la muestra de sangre entera se trata previamente para llevar a cabo una separación suero/plasma, o bien existe localizado sobre la tira inmunocromatográfica un relleno para la separación del plasma con el fin de retardar el revelado de las células de sangre sobre la membrana de revelado inmunocromatográfico. Ambos procedimientos se caracterizan por no reventarse los eritrocitos en la sangre entera y no perderse pigmentos rojos procedentes de los eritrocitos. Sin embargo, la separación previa del suero/plasma tiene una desventaja en coste y esfuerzos. El procedimiento que usa el relleno de separación de plasma sobre la tira inmunocromatográfica tiene un problema con una reproducibilidad de un tiempo de medición o similar, debido a la viscosidad de la sangre entera, y es difícil de usar en una inmunocromatografía en la cual debería revelarse otro líquido después del revelado de una muestra a ensayar.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento inmunocromatográfico en el cual se trate previamente una muestra de sangre entera mediante un procedimiento rápido y conveniente, un enjuiciamiento que no esté afectado por una hemolisis de la sangre entera que cause una coloración temporal de la membrana de revelado inmunocromatográfico con rojo, y que la muestra de sangre entera pueda analizarse de manera rápida y conveniente, y a un bajo coste.

Medios para resolver los problemas

El problema puede resolverse mediante un procedimiento inmunocromatográfico de la presente invención, caracterizado por comprender las etapas siguientes:

(1) preparación de una muestra obtenida a partir de sangre entera mediante hemolisis de la sangre entera y un tratamiento previo para posibilitar el revelado cromatográfico (referido aquí en adelante como una etapa para la preparación de una muestra obtenida a partir de sangre entera o una etapa preparativa),

(2) revelado de la muestra resultante sobre una membrana de revelado para inmunocromatografía (referido aquí en adelante como una etapa de revelado), y

(3) revelado de un líquido de lavado sobre la membrana de revelado para inmunocromatografía, con el fin de separar, de esta forma, un pigmento rojo obtenido del eritrocito de la membrana de revelado para inmunocromatografía (referida aquí en adelante como una etapa para la separación de un pigmento rojo o una etapa de separación), en el que

la muestra obtenida a partir de sangre entera se prepara poniendo en contacto la sangre entera con un detergente no iónico, con el fin de hemolizar, de esta forma, la sangre entera y solubilizar un componente contenido en la sangre entera y que tiene un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de la membrana de revelado para inmunocromatografía.

En el contexto de la presente invención, se describe que el tratamiento para posibilitar el revelado cromatográfico es un tratamiento para solubilizar, separar, o cambiar a una partícula de tamaño pequeño un componente contenido en

la sangre entera y que tiene un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de la membrana de revelado para inmunocromatografía.

Además, en el contexto de la presente invención, se describe que la muestra obtenida a partir de sangre entera se prepara pasando la sangre entera a través de un filtro para, de esta forma, hemolizar la sangre entera y separar un componente contenido en la sangre entera y que tiene un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de la membrana de revelado para inmunocromatografía.

Además, en el contexto de la presente invención, se describe que la muestra obtenida a partir de sangre entera se prepara rompiendo bajo una alta presión o mediante ultrasonidos la sangre entera para, de esta forma, hemolizar la sangre entera y cambiar a una partícula de tamaño pequeño un componente contenido en la sangre entera y que tiene un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de la membrana de revelado para inmunocromatografía.

Además, en el contexto de la presente invención, se describe que la muestra obtenida a partir de sangre entera se prepara poniendo en contacto la sangre entera con un disolvente orgánico para, de esta forma, hemolizar la sangre entera y solubilizar un componente contenido en la sangre entera y que tiene un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de la membrana de revelado para inmunocromatografía.

La presente invención se refiere a un kit para inmunocromatografía caracterizado porque comprende (1) una tira para inmunocromatografía y (2) un líquido de dilución para la sangre entera que contiene un detergente no iónico, en el que el líquido de dilución contiene el detergente no iónico a una concentración tal que, cuando la sangre entera se diluye con el líquido de dilución para preparar una muestra para inmunocromatografía, se hemoliza la sangre total.

Efectos de la invención

De acuerdo con el procedimiento inmunocromatográfico de la presente invención, no es necesario un medio para evitar la hemólisis de la sangre entera, lo cual es esencial en procedimientos convencionales. Además, puede medirse inmunocromatográficamente una muestra de sangre entera a un bajo coste mediante un tratamiento previo conveniente de la muestra sangre entera y revelado inmunocromatográfico. Además, la muestra de sangre entera puede medirse de manera conveniente y rápida, con pocos efectos causados por variaciones en la viscosidad de la sangre entera.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El problema anterior puede resolverse mediante el procedimiento de la presente invención tal como se describe más adelante. Es decir, la sangre entera se hemoliza, por ejemplo, mediante solubilización o reventamiento de eritrocitos. Después de que uno o más componentes que tienen un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de la membrana de revelado para inmunocromatografía, los cuales están contenidos en la sangre entera, son, por ejemplo, solubilizados, separados, o cambiados a una partícula de tamaño pequeño, se revela la muestra obtenida de la sangre entera. De esta forma, no ocurre la obstrucción de los poros en la membrana de revelado inmunocromatográfico durante el revelado. Después del revelado de la muestra obtenida de sangre entera, se revela otro líquido sobre la membrana de revelado para separar por lavado los componentes rojos (fundamentalmente hemoglobina) generados por hemólisis, sobre la membrana de revelado.

Un tamaño de poro de una membrana de revelado comúnmente usado en inmunocromatografía es generalmente de aproximadamente 2 a 20 μm . Cuando las células de sangre (por ejemplo, un eritrocito que tiene un diámetro de aproximadamente 8 μm , un leucocito que tiene un diámetro mayor que el del eritrocito, o una plaqueta que tiene un diámetro ligeramente menor que el de un eritrocito) o agregados obtenidos a partir de fibrina o fosfolípidos, se disuelven y solubilizan con un detergente no iónico, la muestra tratada puede revelarse sobre una de dichas membranas de revelado sin una obstrucción de los poros en la membrana de revelado. La muestra obtenida de sangre entera causa la coloración con rojo de la membrana de revelado inmunocromatográfico. Los componentes rojos obtenidos de la sangre entera hemolizada pueden separarse mediante lavado de la membrana de revelado, por ejemplo, con un licor de lavado o un líquido que contiene un substrato para un procedimiento de enzima. Después de lavado, puede observarse una línea de teñido para su enjuiciamiento, coloreada, por ejemplo, por una reacción inmunológica o enzimática. La presente invención está basada en los hallazgos anteriores.

En la etapa preparativa en el procedimiento de la presente invención, no se limita particularmente un procedimiento para la preparación de la muestra obtenida de sangre entera, siempre y cuando que la sangre entera se hemolice usando un detergente no iónico y pueda llevarse a cabo un tratamiento para posibilitar el revelado cromatográfico.

El término "tratamiento para posibilitar el revelado cromatográfico" tal como se usa aquí, significa un tratamiento el cual posibilita un revelado cromatográfico sobre una membrana de revelado inmunocromatográfico en la etapa de revelado siguiente. Más particularmente, el tratamiento significa, pero sin limitarse a ellos, un tratamiento para, por ejemplo, solubilizar, separar, o cambiar a una partícula de tamaño pequeño un componente contenido en la sangre entera y que tiene un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro (preferiblemente el límite inferior de tamaños de poros) de una membrana de revelado para inmunocromatografía [por ejemplo, diversas células de sangre (tal como un eritrocito, diversos leucocitos, o una plaqueta), membranas obtenidas a partir de células de sangre hemolizada (tal como una membrana de eritrocito, diversas membranas de leucocitos, o una membrana de plaqueta), o agregados obtenidos a partir de fibrina o fosfolípidos].

ES 2 335 011 T3

Como el procedimiento para la preparación de la muestra obtenida de sangre entera tal como se describe y divulga en el contexto de esta invención, puede mencionarse, por ejemplo, un procedimiento que usa un detergente, un procedimiento que usa un filtro, un procedimiento que usa la rotura bajo una alta presión o ultrasonidos, o un procedimiento que usa un disolvente orgánico. En la etapa preparativa, puede llevarse a cabo solamente uno cualquiera de los procedimientos anteriores, o pueden llevarse a cabo dos o más procedimientos como una combinación de los mismos.

En el procedimiento que usa un detergente, la muestra obtenida de sangre entera se prepara poniendo en contacto la sangre entera extraída de un sujeto con un detergente para, de esta forma, hemolizar la sangre entera y solubilizar uno o más componentes que tienen un tamaño de partícula mayor que una membrana de revelado inmunocromatográfico contenida en la sangre entera. En el procedimiento que usa un detergente, los componentes que tienen un tamaño de partícula mayor que el tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico contenidos en la sangre entera son solubilizados con el detergente. Como un resultado de ello, la muestra obtenida de sangre entera puede revelarse en la etapa de revelado siguiente sin obstrucción de los poros en la membrana de revelado inmunocromatográfico.

Un detergente tiende a reunir en una intercara entre dos sustancias, y cambia las propiedades de la intercara. Una molécula de detergente que tiene dichas propiedades está compuesta de grupos que tienen características opuestas, es decir, un grupo lipófilo y un grupo hidrófilo. Un detergente que puede usarse en la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando que tenga dichas propiedades. Como el detergente, se menciona un detergente no iónico.

Los detergentes no iónicos incluyen, por ejemplo, polioxietileno alquiléter, polioxietileno alquilaliléter, derivados de polioxietileno, éster de ácido graso de sorbitano, éster de ácido graso de polioxietileno sorbitano, éster de ácido graso de polioxietileno sorbitol, éster de ácido graso de glicerina, polioxietileno alquilamina, y alquilalcanolamina.

En el procedimiento tal como se describe y divulga en el contexto de la presente invención puede usarse, por ejemplo, solamente uno cualquiera de dichos detergentes no iónicos, pero sin limitarse a los detergentes no iónicos anteriormente mencionados, o pueden usarse dos o más detergentes como una combinación de los mismos. Además, el detergente(s) puede usarse conjuntamente con un agente adicional tal como sales, urea, y/o un disolvente orgánico, o un tratamiento adicional tal como filtración (a través de un filtro), rotura bajo alta presión, o ultrasonidos.

Cuando se usa el detergente no iónico, puede seleccionarse de manera apropiada una concentración del mismo. Un intervalo aplicable de concentración depende de cada detergente a usar, y preferiblemente está alrededor de una concentración de micela crítica o más que de una concentración de micela crítica. Un líquido que contiene el detergente(s) preparado ajustando una concentración de cada detergente se le denomina como un líquido detergente. Cuando una concentración de detergente en el líquido detergente es demasiado alta, la viscosidad del líquido detergente a veces llega a ser más alta que la de la sangre entera, dependiendo de las propiedades del detergente. En ese caso, es difícil mezclar la sangre entera con el líquido detergente, y como resultado de ello, la sangre entera no puede solubilizarse suficientemente. Por el contrario, cuando una concentración del detergente en el líquido detergente es demasiado baja, la solubilización de la sangre entera es a veces demasiado lenta o llega a ser imposible, y como un resultado de ello, el revelado inmunocromatográfico no puede llevarse a cabo normalmente.

Más particularmente, cuando el monolaurato de polioxietileno (Tween 20TM; Sigma), un éster de ácido graso de polioxietileno sorbitol clasificado dentro de un detergente no iónico, se usa solo, una concentración final del mismo en la reacción de hemólisis es preferiblemente de 2 hasta 30%, más preferiblemente de 3 hasta 20%, lo más preferiblemente de 10 hasta 20%.

Cuando el éster mono-para-iso-octilfenilo de polietileno glicol (Triton X-100TM; Sigma), un polioxietileno alquiléter clasificado dentro de un detergente no iónico, se usa solo, una concentración final del mismo en la reacción de hemólisis es preferiblemente de 0,1 hasta 30%, más preferiblemente de 0,3 hasta 20%, lo más preferiblemente de 0,5 hasta 10%.

Cuando el polioxietileno lauriléter (Emulgen 108TM; Kao), un polioxietileno alquiléter clasificado dentro de un detergente no iónico, se usa solo, una concentración final del mismo en la reacción de hemólisis es preferiblemente de 0,01 hasta 20%, más preferiblemente de 1 hasta 20%, lo más preferiblemente de 2,5 hasta 10%.

Incluso si una concentración de detergente es menor que los intervalos de concentración ejemplificados, pueden obtenerse los mismos efectos usando diversos detergentes como una combinación de los mismos. Por ejemplo, cuando cinco tipos diferentes de detergentes (es decir, Emulgen 108, Triton X-100, Tween 20, Amphitol 86B y CHAPS) se usan independientemente solos al 0,1% como una concentración final en la reacción de hemólisis, no puede llevarse a cabo la solubilización de la sangre entera, el teñido inmunocromatográfico, y el revelado inmunocromatográfico, tal como se muestra en el Ejemplo 1. Sin embargo, cuando se usan los mismos detergentes como una combinación de los mismos (cada concentración = 0,1%), puede llevarse a cabo la solubilización de la sangre entera, el teñido inmunocromatográfico, y el revelado inmunocromatográfico, tal como se muestra en el Ejemplo 3.

Por el contrario, incluso si una concentración de detergente es mayor que el intervalo de concentración ejemplificado, pueden obtenerse los mismos efectos usando un detergente comercialmente disponible diluido a una concentración apropiada. Por ejemplo, cuando el éster mono-para-iso-octilfenilo de polietileno glicol (Triton X-100) se comercializa

ES 2 335 011 T3

como "Detergente X" (solución acuosa al 10%) y se mezcla con un volumen igual de sangre entera, la concentración final de "Detergente X" es del 50%, pero la concentración substancial de Triton X-100 es del 5%, y como un resultado de ello, pueden obtenerse los mismos efectos.

5 Como un disolvente para la dilución del detergente, puede usarse no solamente una solución acuosa al 100%, sino también un líquido que contenga un disolvente orgánico para la hemólisis y el revelado inmunocromatográfico. Por ejemplo, el PB40 es una solución al 40% de cloruro de parametil trimetil amonio, que contiene 20 hasta 30% de isopropanol.

10 Una concentración preferida varía de acuerdo, por ejemplo, con un tratamiento previo de la sangre entera, los procedimientos opcionales ejemplificados anteriormente, y/o las propiedades de un ensayo inmunocromatográfico, y en consecuencia, la concentración del detergente no está limitada a los intervalos ejemplificados anteriores.

15 Una cierta relación del líquido detergente a la sangre entera es un factor importante para un revelado inmunocromatográfico normal. Cuando la relación del líquido detergente (es decir, el contenido en detergente) es demasiado baja, los componentes contenidos en la sangre entera no son a veces suficientemente solubilizados, y como un resultado de ello, se inhibe un revelado inmunocromatográfico normal. Además, se prefiere un contenido incrementado del líquido detergente para un revelado inmunocromatográfico normal y estable en un tiempo más corto. Por el contrario, cuando la relación del líquido detergente es demasiada alta, la relación de sangre entera disminuye relativamente, y como un resultado de ello, se reduce a veces la sensibilidad en la medición. Una relación aplicable del líquido detergente a la sangre entera depende de cada detergente a usar o de una concentración del mismo, y la relación (S/WB) del líquido detergente (S) a la sangre entera (WB) es preferiblemente de 1/10 (v/v) o mayor.

25 Además de los efectos anteriores, una concentración del líquido detergente o una relación del mismo a la sangre entera afecta a veces una inhibición de las reacciones en inmunocromatografía o a un incremento en el valor de fondo obtenido a partir del teñido no específico. Por ello, se prefiere seleccionar las condiciones óptimas (tal como un detergente a usar, una concentración del mismo, una relación del mismo a la sangre entera, o un tiempo de mezclado) de acuerdo, por ejemplo, con un procedimiento de medición, un producto a medir, o un tiempo de medición.

30 A veces, un cierto detergente inhibe diversas reacciones de unión (tal como una reacción antígeno-anticuerpo), reacciones de enzimas, o propiedades del coloide de oro o similar sobre la inmunocromatografía, incluso si el detergente se usa a una concentración capaz de realizar el revelado inmunocromatográfico. Para determinar una concentración óptima del mismo, se prefiere examinar de manera independiente y cuidadosa las condiciones óptimas con respecto a cada inmunocromatografía y/o cada producto a medir.

35 En el procedimiento que usa un filtro, la muestra obtenida de sangre entera se prepara pasando la sangre entera extraída de un sujeto a través de un filtro para, de esta forma, hemolizar la sangre entera y separar uno o más componentes que tienen un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico contenidos en la sangre entera. En el procedimiento que usa un filtro, los componentes que tienen un tamaño de poro mayor que un tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico contenidos en la sangre entera son separados por el filtro. Como un resultado de ello, la muestra obtenida de sangre entera puede revelarse en la etapa de revelado siguiente sin una obstrucción de los poros en la membrana de revelado inmunocromatográfico.

45 Como un filtro que puede usarse en la etapa preparativa, puede mencionarse, por ejemplo, un filtro de jeringuilla. Una vez que la sangre entera se ha recogido en una jeringuilla apropiada [por ejemplo, jeringuilla de 1 ml (Terumol)] mediante un tubo, se sujeta un filtro de jeringuilla a la parte superior de la jeringuilla, y la sangre entera de la jeringuilla puede filtrarse a través del filtro de jeringuilla por presión. Mediante la presión durante la filtración, las células de sangre se rompen, los agregados que tienen un tamaño mayor que un tamaño de poro del filtro (por ejemplo, fragmentos de membrana obtenidos a partir de eritrocitos rotos, o agregados obtenidos a partir de lípidos o similares) se separan, y solamente las partículas que tienen un tamaño menor que un tamaño de poro del filtro se recogen en un filtrado resultante. Un tamaño de poro del filtro es preferiblemente menor que un tamaño de poro (más preferiblemente que el límite inferior de los tamaños de los poros) de una membrana de revelado para inmunocromatografía. Por ejemplo, cuando un tamaño de poro promedio de una membrana de revelado inmunocromatográfico es de 5 μm , un tamaño de poro del filtro es preferiblemente menor de 5 μm . Cuando los tamaños de poros de una membrana de revelado inmunocromatográfico son de 5 hasta 8 μm , un tamaño de poro del filtro es preferiblemente de 5 μm o menor. En relación con esto, el tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico significa un intervalo que contiene aproximadamente el 80% de todos los tamaños de poros, y el tamaño de poro de un filtro significa el tamaño de poro máximo.

60 En el procedimiento que usa la rotura bajo una alta presión o ultrasonidos, la muestra obtenida de sangre entera se prepara rompiendo bajo una alta presión o ultrasonidos la sangre entera extraída de un sujeto para, de esta forma, hemolizar la sangre entera y cambiar a uno o más componentes de partículas de pequeño tamaño que tienen un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico contenidos en la sangre entera. En el procedimiento que usa la rotura bajo una alta presión o ultrasonidos, los componentes que tienen un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico contenidos en la sangre total, se cambian a una partícula de pequeño tamaño mediante rotura bajo una alta presión o ultrasonidos. Como un resultado de ello, la muestra obtenida de sangre entera puede revelarse en la etapa de revelado siguiente sin una obstrucción de los poros en la membrana de revelado inmunocromatográfico.

Como los ultrasonidos que pueden usarse en la etapa preparativa, pueden mencionarse por ejemplo, un tratamiento supersónico comúnmente usado para la rotura de células. Como la rotura bajo una alta presión, puede mencionarse, por ejemplo, un aparato para la presión de carga tal como una prensa Francesa. La prensa Francesa puede cargar una alta presión a una muestra que contiene células, y puede romper células mediante una reducción drástica de la presión al mismo tiempo que se recoge una porción de la muestra. En consecuencia, la prensa Francesa es útil en la rotura y dispersión de los componentes que tienen un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico contenidos en la sangre entera.

El procedimiento para la preparación de la muestra obtenida de sangre entera tal como se describe y divulga en el contexto de la presente invención, no está particularmente limitado, siempre y cuando que este pueda hemolizar la sangre entera, y los componentes anteriores contenidos en la sangre entera puedan solubilizarse, cambiarse a una partícula de tamaño pequeño, o separarse.

Un disolvente orgánico que puede usarse en la etapa preparativa no está particularmente limitado, siempre y cuando este pueda hemolizar la sangre entera, y los componentes que tienen un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de una membrana de revelado inmunocromatográfico contenidos en la sangre entera puedan solubilizarse. Como el disolvente orgánico, puede mencionarse, por ejemplo, cetonas (tal como acetona), alcoholes (tal como metanol, etanol, o 2-propanol), o acetonitrilo. Una concentración del disolvente orgánico puede seleccionarse de manera apropiada de acuerdo con un disolvente orgánico a usar o las condiciones (por ejemplo, condiciones cuando se mezcla con sangre entera, o condiciones experimentales en inmunocromatografía o de medición), tal como se ha descrito previamente en la sección anterior de detergentes.

La etapa de revelado en el procedimiento tal como se describe en el contexto de la presente invención, puede llevarse a cabo de acuerdo con una etapa de revelado en un procedimiento inmunográfico convencional, excepto que se use la muestra obtenida de sangre entera obtenida en la etapa preparativa. En la muestra obtenida de sangre entera usada en la etapa de revelado, los componentes que pueden causar la obstrucción de los poros en la membrana de revelado inmunocromatográfico, son previamente solubilizados, separados, o cambiados a una partícula de pequeño tamaño. En consecuencia, el revelado inmunocromatográfico puede llevarse a cabo sin una obstrucción de los poros en la membrana de revelado inmunocromatográfico.

Después de la etapa de revelado, la membrana de revelado inmunocromatográfico se colorea con pigmentos rojos obtenidos a partir de eritrocitos rotos en la sangre entera, y por ello, es difícil observar el teñido de una línea de enjuiciamiento o similar. En consecuencia, después de la etapa de revelado, en la etapa de separación en el procedimiento de la presente invención, se revela otro líquido sobre la membrana de revelado inmunocromatográfico para separar los pigmentos rojos de la membrana de revelado inmunocromatográfico.

El líquido para la separación de los pigmentos rojos (referido aquí en adelante como líquido de separación) no está particularmente limitado, siempre y cuando este pueda separar los pigmentos rojos mediante su revelado sobre la membrana de revelado inmunocromatográfico. Como el líquido para la separación de los pigmentos rojos, puede usarse un líquido de lavado para simplemente la separación por lavado de los pigmentos rojos (por ejemplo, agua o un tampón). En un caso (tal como una inmunocromatografía de enzima) en el cual se revela un sustrato para la coloración enzimática después del primer revelado, puede usarse un líquido conteniendo un líquido como el líquido de separación para la separación por lavado de los pigmentos rojos.

El inicio del revelado del líquido de separación no está particularmente limitado, siempre y cuando la muestra obtenida de sangre entera esté suficientemente revelada y los pigmentos rojos puedan separarse. Generalmente, después de que comienza el revelado de la muestra obtenida de sangre entera, puede pararse el revelado del líquido de separación. Además, el revelado del líquido de separación puede pararse justamente antes del inicio del revelado de la muestra obtenida de sangre entera, seleccionando apropiadamente la posición de inicio de cada revelado.

El kit tal como se divulga en el contexto de la presente invención para inmunocromatografía comprende al menos (1) una tira para inmunocromatografía y (2) un líquido de dilución para la sangre entera que contiene un detergente. Como el detergente, puede usarse un detergente usado en la etapa preparativa. Una concentración del detergente contenido en el líquido de dilución para la sangre entera no está particularmente limitada, siempre y cuando que cuando la sangre entera se diluya con él para preparar una muestra para inmunocromatografía (es decir, la muestra obtenida de sangre entera), pueda hemolizarse la sangre entera.

El líquido de dilución para la sangre entera puede contener además una substancia (tal como un anticuerpo o un antígeno) el cual se une específicamente a un analito en una muestra (es decir, sangre entera) y/o un agente (tal como proteínas, azúcares, o compuestos de alto peso molecular) para la estabilización de reactivos.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente, pero sin manera alguna limitarla, mediante los Ejemplos siguientes.

ES 2 335 011 T3

Ejemplo 1

En este ejemplo, la sangre entera se hemolizó y solubilizó con diversos detergentes para preparar muestras obtenidas de sangre entera, y las muestras obtenidas de sangre entera resultantes se sometieron a un procedimiento inmunocromatográfico de enzima para medir la IgE específica, de acuerdo con los procedimientos siguientes.

(1) Preparación de tira para inmunocromatografía de enzima

(1-1) Preparación de membrana inmovilizada con alérgeno

Se cortó una membrana de nitrocelulosa (HF180; tamaño de poro = 5 hasta 8 μm ; Millipore) en una pieza rectangular (5 mm x 25 mm). Se aplicó linealmente una solución acuosa de proteínas de alérgeno de ácaro extraídas (1 mg/ml) con una anchura de 1 mm en la posición de 15 mm a partir de un extremo (corriente arriba) de la membrana. En este caso, la solución acuosa se preparó previamente diluyendo un extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Glia) con 5 mmol/l de un tampón de borato (pH 8,5) y dializando la solución diluida.

La membrana se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora seguida de reposo a 37°C durante 30 minutos para inmovilizar las proteínas de ácaro extraídas sobre la membrana. La membrana se mantuvo en un desecador de gel de sílice a temperatura ambiente durante una noche para obtener una membrana inmovilizada con alérgeno de ácaro.

(1-2) Preparación de anticuerpo anti-IgE marcado con enzima

Se digirió con pepsina un anticuerpo monoclonal de ratón de IgE anti-humano. Después de reducir la mezcla de reacción con 2-mercaptoetilamina, se llevó a cabo una filtración por gel para obtener un fragmento Fab' purificado (1 mg).

Mientras tanto, se diluyó fosfatasa alcalina intestinal bovina (2 mg) con un tampón de fosfato hasta una concentración de 2 mg/ml. Después de diálisis, la solución diluida se mezcló con 100 μl de 7,5 mmol/l de N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP). Después de llevar a cabo la reacción a 4°C durante 5 horas, el conjunto se dializó en un tampón de fosfato para obtener fosfatasa alcalina unida a piridiltiopropionato (PDP).

Después de mezclar el anticuerpo Fab' anti-IgE (1 ml) con un volumen igual de la fosfatasa alcalina unida a PDP (1 ml), se agregaron adicionalmente 40 μl de 1 mol/l de hidroxilamina. Después de llevar a cabo la reacción a 4°C durante 3 días, se separaron el anticuerpo Fab' anti-IgE y la fosfatasa alcalina unida a PDP sin reaccionar mediante filtración por gel usando una columna de filtración por gel (TSgel™ G3000SW; Toso) para obtener una solución de anticuerpo anti-IgE marcado con enzima.

(1-3) Preparación de relleno conteniendo anticuerpo marcado con enzima

Después de que la solución de anticuerpo anti-IgE marcado con enzima preparado en el Ejemplo 1(1-2) se diluyera con 5 mmol/l de tampón de fosfato (pH 7,2) conteniendo sacarosa al 5,0%, se pulverizaron 10 μl de la solución diluida (1 μg de anticuerpo) en un relleno adsorbente (5 mm x 5 mm, PREM1420; Pole). El relleno se secó en un desecador de gel de sílice a temperatura ambiente bajo presión reducida (no superior a 13,3 kPa) durante una noche, para obtener un relleno de anticuerpo marcado con enzima.

(1-4) Preparación de relleno para la recepción de la muestra

Se cortó un relleno de fibra de vidrio en una pieza rectangular (5 mm x 18 mm). La pieza se sumergió en una solución acuosa que contenía sacarosa al 0,5%, Tween 20 al 0,2%, y alcohol polivinílico al 0,1% (grado de polimerización = aproximadamente 500). Después de eliminar un exceso de líquido de la pieza, la pieza se secó al aire para obtener un relleno para la recepción de una muestra.

(1-5) Preparación de relleno adsorbente

Se cortó un relleno de celulosa (AP25; Millipore) en una pieza rectangular (5 mm x 25 mm) para obtener un relleno adsorbente.

(1-6) Preparación de tira para inmunocromatografía

Se cortó una lámina adhesiva de plástico (BioDot) en una pieza rectangular (5 mm x 60 mm). A la lámina adhesiva, se unieron el relleno para la recepción de la muestra [preparado en el Ejemplo 1(1-4)], el anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (AP) [preparado en el Ejemplo 1(1-3)], la membrana inmovilizada con alérgeno de ácaro [preparada en el Ejemplo 1(1-1)], y el relleno adsorbente [preparado en el Ejemplo 1(1-5)], en este orden en la dirección de corriente arriba a corriente abajo con respecto a la dirección de revelado, para obtener una tira para inmunocromatografía. En este caso, las piezas adyacentes unidas sobre la lámina adhesiva se solaparon una con otra a una anchura de aproximadamente 1 mm.

ES 2 335 011 T3

(2) Preparación de muestra obtenida de sangre entera mediante hemólisis y solubilización y medición en inmunocromatografía

(2-1) Preparación de líquidos detergentes

Se prepararon agua desionizada, solución salina fisiológica (150 ml/l de cloruro sódico líquido), y 10 mmol/l de un tampón de fosfato (pH 7,5, 150 mmol/l de cloruro sódico). Se diluyeron independientemente Triton X-100 (Sigma), Tween 20 (Sigma), dodecil sulfato sódico, Emulgen 108 (Kao), PB40 (NOF Corporation), Amphitol 86B (Kao), y CHAPS (Dojindo) con el tampón de fosfato anterior hasta las concentraciones de 0,2%, 1,0%, 5,0%, y 20%.

(2-2) Preparación de muestras mediante el mezclado de volúmenes iguales de sangre entera y líquido detergente y observación sobre hemólisis

Se mezcló sangre entera humana (100 µl) recogida usando un tubo que contenía anticoagulante de heparina con un volumen igual de de cada líquido detergente (100 µl) para preparar cada muestra. Después de 10 minutos a partir del mezclado, se observó visualmente la hemólisis en cada muestra. La “hemólisis” se juzgó sobre la base de un estado transparente causado por una solubilización de la membrana eritrocítica y elución de los pigmentos rojos, tal como la hemoglobina procedente de eritrocitos.

(2-3) Medición inmunocromatográfica de enzima

Cada parte alícuota (50 µl) de muestras obtenidas de sangre entera preparadas mediante hemólisis y solubilización se dispensó dentro de cada pocillo de una microplaca. La tira para inmunocromatografía se colocó de manera que el relleno de recepción de la muestra se introdujera dentro del pocillo, y se produjera un revelado cromatográfico de las muestras mediante un fenómeno capilar. Después de 10 minutos a partir del comienzo del revelado, se revelaron cromatográficamente 200 µl de una solución de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfórico (BCIP; Boeringer Mannheim).

Al igual que con las muestras anteriores, se usaron la muestra 1 (IgE específica de ácaro = 0 IU/ml), muestra 2 (IgE específica de ácaro = 3 IU/ml), y muestra 3 (IgE específica de ácaro = 10 IU/ml). Las cantidades de IgE específica de ácaro se midieron mediante un análisis cuantitativo convencional (kit de medición de anticuerpo IgE específica AlaSTAT; obtenido de Latron y fabricado por DPC, US) y medido en IU/ml, una unidad patrón internacional.

Después del revelado cromatográfico, se juzgó visualmente un grado de teñido sobre el área inmovilizada con alérgeno (la banda que tiene una anchura de 1 mm), y los resultados se muestran en las Tablas 1 a 8. Los símbolos “-”, “±”, “+”, y “++” en las Tablas 1 a 8 (y en las Tablas 9 a 19 descritas más adelante) significan “no coloreado”, “ligeramente coloreado”, “claramente coloreado”, y “fuertemente coloreado”, respectivamente. Una concentración de cada líquido detergente en las Tablas muestra una concentración del mismo usada en el Ejemplo 1(2-2), y en consecuencia, la concentración final del mismo en la reacción de hemólisis fue la mitad de la concentración mostrada en las Tablas.

TABLA 1 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de líquido no detergente				
Conc. de deter- gente	Agua desioni- zada	Solución salina fisioló- gica	Tampón de fosfa- to	
Hemólisis	Hml	No	No	
Anticuerpo IgE específico de ácaro (IU/ml)				
Muestra 1	0	FCD	FCD	FCD
Muestra 2	3	FCD	FCD	FCD
Muestra 3	10	FCD	FCD	FCD
[Hml]= Hemolizada; No = No hemolizada;				
FCD = Fallo en el revelado cromatográfico				

ES 2 335 011 T3

TABLA 2

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Tween 20					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	No	No	No
	Anticuerpo IgE específico de ácaro				
		(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	FCD	FCD
	Muestra 2	3	+	FCD	FCD
	Muestra 3	10	+	FCD	FCD

TABLA 3 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de dodecil sulfato sódico					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	Hml
	Anticuerpo IgE específico de ácaro				
		(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	-	-
	Muestra 2	3	-	-	±
	Muestra 3	10	-	-	+

TABLA 4

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Emulgen 108					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No
	Anticuerpo IgE específico de ácaro				
		(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	-	FCD
	Muestra 2	3	+	+	FCD
	Muestra 3	10	++	++	FCD

ES 2 335 011 T3

TABLA 5

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Triton X-100					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No
	Anticuerpo IgE específico de ácaro				
		(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	-	FCD
	Muestra 2	3	+	+	FCD
	Muestra 3	10	++	++	FCD

TABLA 6 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de PB40					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No
	Anticuerpo IgE específico de ácaro				
		(IU/ml)			
	Muestra 1	0	FCD	-	FCD
	Muestra 2	3	FCD	+	FCD
	Muestra 3	10	FCD	++	FCD

TABLA 7 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Amphitol 86B					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No
	Anticuerpo IgE específico de ácaro				
		(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	-	FCD
	Muestra 2	3	+	+	FCD
	Muestra 3	10	++	++	FCD

ES 2 335 011 T3

TABLA 8 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de CHAPS					
Conc. de detergente		20%	5%	1%	0,2%
Hemolisis		Hml	Hml	Hml	No
Anticuerpo IgE específico de ácaro					
	(IU/ml)				
Muestra 1	0	-	-	-	FCD
Muestra 2	3	+	+	+	FCD
Muestra 3	10	++	++	++	FCD

20 Ejemplo 2

En este ejemplo, la sangre entera se hemolizó y solubilizó con diversos detergentes para preparar muestras obtenidas de sangre entera, y la IgE específica se midió mediante un procedimiento inmunocromatográfico de coloide de oro, de acuerdo con los procedimientos siguientes.

25 (1) Preparación de tira para inmunocromatografía de coloide de oro

(1-1) Preparación de membrana inmovilizada con alérgeno

30 De acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 1(1-1), se preparó una membrana inmovilizada con alérgeno de ácaro pulverizando una solución acuosa de proteínas de alérgeno de ácaro extraídas sobre una membrana de nitrocelulosa linealmente con una anchura de 1 mm.

(1-2) Preparación de anticuerpo anti-IgE marcado con coloide de oro

35 Se diluyó un anticuerpo monoclonal de IgE de ratón anti-humano (1 mg) con un tampón de fosfato (2 mmol/l, pH 7,0) hasta una concentración de 0,1 mg/ml, y la solución diluida se dializó. Mientras se agitaban 100 ml de una suspensión de coloide de oro (GOLD COLLOID 20; British BioCell International), se agregaron gota a gota a la suspensión 10 ml de la solución acuosa de anticuerpo monoclonal de IgE de ratón anti-humano. Después de agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agregaron además gota a gota mientras se agitaba 10 ml de albúmina de suero bovino al 10% (BSA, A-7888; Sigma). Después de agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agregaron además 15 ml de una solución acuosa que contenía sacarosa al 5% y Tween 20 al 0,2%. El conjunto se mezcló y centrifugó a 16.000 xg durante una hora a 10°C para separar un sobrenadante.

45 El anticuerpo precipitado remanente marcado con coloide de oro se volvió a suspender en 100 ml de un tampón de bórax (pH 8,0) que contenía sacarosa al 0,5% y Tween 20 al 0,02%. El conjunto se centrifugó a 16.000 xg durante una hora a 10°C para separar el sobrenadante. El anticuerpo precipitado marcado con coloide de oro se volvió a suspender en 100 ml de un tampón de bórax (pH 8,0) que contenía sacarosa al 0,5% y Tween 20 al 0,02%, y el conjunto se centrifugó a 16.000 xg durante una hora a 10°C para separar el sobrenadante. El anticuerpo precipitado marcado con coloide de oro se volvió a suspender en el tampón de bórax (pH 8,0) que contenía sacarosa al 0,5% y Tween 20 al 0,02%, de manera tal que la densidad de la partícula pasó a ser de aproximadamente 10^{13} /ml (absorbancia a una longitud de onda de 520 nm = aproximadamente 14), para obtener una suspensión del anticuerpo anti-IgE marcado con coloide de oro.

55 (1-3) Preparación de relleno conteniendo anticuerpo marcado con coloide de oro

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(1-3), excepto que se usó la suspensión preparada en el Ejemplo 2(1-2) del anticuerpo anti-IgE marcado con coloide de oro, para obtener un relleno que contenía el anticuerpo marcado con coloide de oro.

60 (1-4) Preparación de tira para inmunocromatografía

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(1-6), excepto que se usó el relleno preparado en el Ejemplo 2(1-2) que contenía el anticuerpo marcado con coloide de oro, para obtener una tira para inmunocromatografía de coloide de oro.

65

ES 2 335 011 T3

(2) *Preparación de muestra obtenida de sangre entera mediante hemólisis y solubilización y medición en inmunocromatografía*

(2-1) *Preparación de líquidos detergentes, mezclado con sangre entera, y observación sobre la hemólisis*

De acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 1(2-1), se prepararon diversas soluciones. De acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 1(2-2), se mezcló sangre entera humana (100 μ l) con un volumen igual de cada solución (100 μ l) para preparar cada muestra, y se observó la hemólisis en cada muestra.

(2-2) *Medición inmunocromatográfica de coloide de oro*

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(2-3), excepto que la tira para inmunocromatografía de enzima se reemplazó por la tira para inmunocromatografía de coloide de oro preparada en el Ejemplo 2(1-4), y la solución de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfórico (BCIP; Boeringer Mannheim) se reemplazó por un tampón de fosfato, para llevar a cabo el procedimiento inmunocromatográfico de coloide de oro.

Después del revelado cromatográfico, se juzgó visualmente un grado de coloración sobre el área inmovilizada con alérgeno (la banda que tiene una anchura de 1 mm), y los resultados se muestran en las Tablas 9 a 16.

TABLA 9 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de líquido no detergente				
Conc. de detergente		Agua desionizada	Solución salina fisiológica	Tampón de fosfato
Hemólisis		Hml	No	No
Anticuerpo IgE específico de ácaro (IU/ml)				
Muestra 1	0	FCD	FCD	FCD
Muestra 2	3	FCD	FCD	FCD
Muestra 3	10	FCD	FCD	FCD

TABLA 10

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Tween 20					
Conc. de detergente		20%	5%	1%	0,2%
Hemólisis		Hml	No	No	No
Anticuerpo IgE específico de ácaro (IU/ml)					
Muestra 1	0	-	FCD	FCD	FCD
Muestra 2	3	±	FCD	FCD	FCD
Muestra 3	10	+	FCD	FCD	FCD

ES 2 335 011 T3

TABLA 11 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de dodecil sulfato sódico					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	Hml
	Anticuerpo IgE específico de ácaro	(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	-	-
	Muestra 2	3	-	±	±
	Muestra 3	10	-	±	±

TABLA 12

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Emulgen 108					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No
	Anticuerpo IgE específico de ácaro	(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	-	FCD
	Muestra 2	3	+	±	FCD
	Muestra 3	10	+	+	FCD

TABLA 13

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Triton X-100					
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No
	Anticuerpo IgE específico de ácaro	(IU/ml)			
	Muestra 1	0	-	-	FCD
	Muestra 2	3	±	±	FCD
	Muestra 3	10	+	+	FCD

ES 2 335 011 T3

TABLA 14 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de PB40						
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%	
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No	
	Anticuerpo IgE específico de ácaro					
		(IU/ml)				
	Muestra 1	0	FCD	-	-	FCD
	Muestra 2	3	FCD	±	±	FCD
	Muestra 3	10	FCD	+	+	FCD

TABLA 15 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de Amphitol 86B						
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%	
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No	
	Anticuerpo IgE específico de ácaro					
		(IU/ml)				
	Muestra 1	0	-	-	-	FCD
	Muestra 2	3	±	±	±	FCD
	Muestra 3	10	+	+	+	FCD

TABLA 16 (Comparativa)

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de CHAPS						
	Conc. de detergente	20%	5%	1%	0,2%	
	Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No	
	Anticuerpo IgE específico de ácaro					
		(IU/ml)				
	Muestra 1	0	-	-	-	FCD
	Muestra 2	3	±	±	±	FCD
	Muestra 3	10	+	+	+	FCD

ES 2 335 011 T3

Ejemplo 3

En este ejemplo, la sangre entera se hemolizó y solubilizó con líquidos mezclados que contenían cinco detergentes a la misma concentración, para preparar muestras obtenidas de sangre entera, y la IgE específica se midió mediante un procedimiento inmunocromatográfico de enzima, de acuerdo con los procedimientos siguientes.

(1) Preparación de tira para inmunocromatografía de enzima

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(1), para preparar una tira para inmunocromatografía de enzima.

(2) Preparación de mezcla de líquidos de detergentes, mezclado con sangre entera, y observación sobre la hemolisis

Se prepararon cuatro tipos de líquidos mezclados conteniendo cada uno cinco detergentes (Triton X-100, Tween 20, Emulgen 108, Amphitol 86B, y CHAPS) a la misma concentración (concentración = 0,04, 0,2, 1 ó 4%), usando 10 mmol/l de tampón de fosfato (pH 7,5, 150 mmol/l de cloruro sódico). Las concentraciones totales de los cinco detergentes en los cuatro líquidos mezclados fueron 0,2, 1,0, 5,0, y 20%, respectivamente. De acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 1(2-2), se mezcló sangre entera humana (100 μ l) con un volumen igual de cada líquido mezclado de detergentes (100 μ l), para preparar cada muestra, y se observó la hemolisis en cada muestra.

(3) Medición inmunocromatográfica de enzima

De acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 1(2-3), se llevó a cabo una medición inmunocromatográfica y un juicio visual. Los resultados se muestran en la Tabla 17. Cada concentración mostrada en la Tabla significa una concentración de cada detergente contenido en cada líquido mezclado usado en el Ejemplo 3(2).

TABLA 17

Muestra preparada mezclando sangre entera con volumen igual de líquido mezclados de diferentes detergentes					
Conc. de detergente	4%	1%	0,2%	0,04%	
Hemolisis	Hml	Hml	Hml	No	
Anticuerpo IgE específico de ácaro					
	(IU/ml)				
Muestra 1	0	-	-	-	FCD
Muestra 2	3	+	+	+	FCD
Muestra 3	10	++	++	++	FCD

Ejemplo 4

(Comparativo)

En este ejemplo, se usó un filtro de jeringuilla para hemolizar la sangre entera y separar los componentes contenidos en la sangre entera que tenían un tamaño mayor que un tamaño de poro del filtro, y la muestra obtenida de sangre entera se usó para medir la IgE específica mediante una inmunocromatografía de enzima.

(1) Preparación de tira para inmunocromatografía de enzima

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(1), para preparar una tira para preparar una tira para inmunocromatografía [membrana de nitrocelulosa = HF180 (tamaño de poro = 5 a 8 μ m)]. Se repitió el mismo procedimiento, excepto que la HF180 se reemplazó por HF240 (tamaño de poro = 3 a 5 μ m), para preparar otra tira para inmunocromatografía. Cada tamaño de poro significa un intervalo que contiene aproximadamente 80% de todos los tamaños de poros.

ES 2 335 011 T3

(2) preparación de muestra obtenida de sangre entera mediante tratamiento con filtro y medición inmunocromatográfica

(2-1) Preparación de filtrados obtenidos de sangre entera mediante tratamiento con diversos filtros de jeringuilla

5 La sangre entera humana recogida usando un tubo que contenía un anticoagulante (heparina), se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 5 μm (Sartorius), un filtro de jeringuilla de 3 μm (Advantec), un filtro de jeringuilla de 1, 2 μm (Sartorius), un filtro de jeringuilla de 0,8 μm (Advantec), o un filtro de jeringuilla de 0,2 μm (Advantec) para recoger cada filtrado. En este caso, el diámetro de cada filtro de jeringuilla fue de 26 mm. Después de la filtración, se observó visualmente la hemólisis. El tamaño de poro de cada filtro significa el tamaño de poro máximo.

(2-2) Medición de inmunocromatografía de enzima

15 Se usaron dos tiras de inmunocromatografía de enzima preparadas en el Ejemplo 4(1) para revelar cada filtrado mediante inmunocromatografía de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(2-3).

Después del revelado, se revelaron cromatográficamente 200 μl de una solución de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfórico (BCIP; Boeringer Mannheim), de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(2-3). En este caso, se usaron las mismas muestras que las descritas en el Ejemplo 1(2-3).

20 Después del revelado cromatográfico, se juzgó visualmente un grado de coloración sobre el área inmovilizada con alérgeno (la banda que tiene un ancho de 1 mm), y los resultados se muestran en las Tablas 18 y 19.

25 TABLA 18

Tira (HF180)							
Muestra filtrada a través de filtro de jeringuilla							
Tamaño de poro del filtro (μm)	No filtrada	5	3	1,2	0,8	0,2	
Hemólisis	No	Hml	Hml	Hml	Hml	Hml	
Anticuerpo específico de ácaro							
(IU/ml)							
Muestra 1	0	FCD	-	-	-	-	-
Muestra 2	3	FCD	+	+	+	+	+
Muestra 3	10	FCD	++	++	++	++	++

50 TABLA 19

Tira (HF240)							
Muestra filtrada a través de filtro de jeringuilla							
Tamaño de poro del filtro (μm)	No filtrada	5	3	1,2	0,8	0,2	
Hemólisis	No	Hml	Hml	Hml	Hml	Hml	
Anticuerpo específico de ácaro							
(IU/ml)							
Muestra 1	0	FCD	FCD	-	-	-	
Muestra 2	3	FCD	FCD	+	+	+	+

ES 2 335 011 T3

TABLA 19 (Continuación)

5	Tira (HF240)						
	Muestra filtrada a través de filtro de jeringuilla						
	Tamaño de poro del filtro (µm)	No filtrada	5	3	1,2	0,8	0,2
10	Hemolisis	No	Hml	Hml	Hml	Hml	Hml
	Anticuerpo específico de ácaro						
		(IU/ml)					
15	Muestra 3	10	FCD	FCD	++	++	++

Aplicabilidad industrial

20 El procedimiento inmunocromatográfico de la presente invención puede aplicarse al análisis de una muestra de sangre entera.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 335 011 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento inmunocromatográfico **caracterizado** por comprender las etapas de:

5

(1) preparación de una muestra obtenida a partir de sangre entera mediante hemolisis de la sangre entera y un tratamiento para posibilitar el revelado cromatográfico,

(2) revelado de la muestra resultante sobre una membrana de revelado para inmunocromatografía, y

10

(3) revelado de un líquido de lavado sobre la membrana de revelado para inmunocromatografía, con el fin de separar, de esta forma, un pigmento rojo obtenido del eritrocito de la membrana de revelado para inmunocromatografía,

15

en el que la muestra obtenida a partir de sangre entera se prepara poniendo en contacto la sangre entera con un detergente no iónico, con el fin de hemolizar la sangre entera y solubilizar un componente contenido en la sangre entera, teniendo dicho componente un tamaño de partícula mayor que un tamaño de poro de la membrana de revelado para inmunocromatografía.

2. Un kit para inmunocromatografía **caracterizado** porque comprende

20

(1) una tira para inmunocromatografía y

(2) un líquido de dilución para la sangre entera que contiene un detergente no iónico,

25

en el que el líquido de dilución contiene el detergente iónico a una concentración tal que cuando la sangre entera se diluye con el líquido de dilución para preparar una muestra para inmunocromatografía, se hemoliza la sangre total.

30

35

40

45

50

55

60

65