

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 111**

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: **14.03.2018 PCT/JP2018/009898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18168906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2018 E 18767951 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2022 EP 3598131**

54 Título: **Pieza de prueba inmunocromatográfica para extracción y medición de antígeno de cadena de azúcar, que es capaz de prevenir reacción no específica**

30 Prioridad:

14.03.2017 JP 2017049155

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

14.03.2023

73 Titular/es:

**DENKA COMPANY LIMITED (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku
Tokyo 103-8338, JP**

72 Inventor/es:

**KATO DAISUKE;
MURAMATSU SHINO y
HATTORI TOMOHIRO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 936 111 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

Pieza de prueba inmunocromatográfica para extracción y medición de antígeno de cadena de azúcar, que es capaz de prevenir reacción no específica

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con un dispositivo inmunocromatográfico para extraer y medir un antígeno de cadena de azúcar, que es capaz de extraer el antígeno de cadena de azúcar con ácido nitroso en una pieza de prueba inmunocromatográfica.

10

Antecedentes de la técnica

La mayoría de los ensayos de diagnóstico rápido que implican un método de inmunocromatografía como principio se han utilizado ampliamente como un medio para medir de forma rápida y sencilla la infección viral o bacteriana y determinar un plan de tratamiento para la misma.

15

En el caso de tales agentes de diagnóstico rápido que implican un método de inmunocromatografía común como principio, una muestra se suspende en una suspensión de muestra y la suspensión luego se suministra a una pieza de prueba inmunocromatográfica, de modo que la medición se puede realizar de forma rápida y sencilla.

20

Para la detección de microorganismos pertenecientes al género *Streptococo*, como el estreptococo β -hemolítico del grupo A y el estreptococo intraoral, es necesario extraer un antígeno de la cadena de azúcar y medir el antígeno de la cadena de azúcar.

25

Por ejemplo, un método en el que se añaden previamente nitrito de sodio y un reactivo neutralizante a una pieza de prueba inmunocromatográfica, de modo que se pueda llevar a cabo una extracción de ácido nitroso en la pieza de prueba inmunocromatográfica solo mediante la operación de suspender una muestra en una solución ácida como el ácido acético y para suministrar la suspensión a la pieza de prueba inmunocromatográfica (Literatura de patentes 1).

30

Además, existe un método, en el que se añade previamente un reactivo ácido y un reactivo neutralizante a una pieza de prueba inmunocromatográfica, y se suspende una muestra en nitrito y se suministra a la pieza de prueba inmunocromatográfica.

35

La mayoría de los reactivos de detección de antígenos del estreptococo β -hemolítico del grupo A actualmente disponibles comercialmente que utilizan un método de inmunocromatografía se utilizan en una prueba mezclando dos soluciones, a saber, una solución de nitrito y una solución ácida, inmediatamente antes de la prueba, para generar ácido nitroso ácido, y extraer un antígeno con el ácido nitroso generado, o utilizar un método de extracción de un antígeno incorporando una almohadilla impregnada con un reactivo ácido en un dispositivo inmunocromatográfico (pieza de prueba inmunocromatográfica) y generando ácido nitroso en la pieza de prueba inmunocromatográfica. Para este método, es necesario neutralizar el ácido nitroso ácido generado, y se agrega un reactivo neutralizante en estado seco sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica, para que el ácido nitroso se neutralice con el reactivo neutralizante. Las literaturas de Patentes 2 y 3 divulgan cada una, piezas de prueba de inmunocromatografía que permiten la medición específica de un antígeno de cadena de azúcar con material poroso tal como un filtro, una fibra de vidrio y una tela no tejida como un material de una región neutralizante. La literatura de patente 4 divulga un método de inmunoensayo para detectar un antígeno de un objetivo de detección en un analito a través de la extracción con un agente de extracción, en donde la detección se realiza en presencia de un oligosacárido cíclico.

40

45

Lista de citas

50

Literatura de patentes

Literatura de patentes 1: Publicación Internacional WO2005/121794

Literatura de patentes 2: Publicación Internacional WO 2017/213227 A1

55

Literatura de patentes 3: Publicación Internacional WO 2017/213228 A1

Literatura de patentes 4: publicación europea EP 3 032 260 A1

Resumen de la invención

60

Problema técnico

La mayoría de los reactivos de detección de antígenos de estreptococo β -hemolítico del grupo A actualmente disponibles en el mercado que utilizan un método de inmunocromatografía emplean, en la extracción de un antígeno, ácido nitroso ácido generado mezclando una solución de nitrito y una solución ácida, y una solución de revelado que contiene el ácido nitroso utilizado en la extracción del antígeno se neutraliza con un reactivo neutralizante agregado

65

en estado seco sobre una pieza de prueba inmunocromatográfica, seguido de una reacción antígeno-anticuerpo para la medición. Sin embargo, este método convencional es problemático porque ocurre una reacción no específica.

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar una pieza de prueba inmunocromatográfica que previene una reacción no específica poniendo en contacto y neutralizando de manera eficiente y continua una solución de revelado que contiene ácido nitroso con un reactivo neutralizante en un método inmunocromatográfico de extracción y medición de un antígeno de cadena de azúcar por extracción con ácido nitroso en la pieza de prueba inmunocromatográfica.

10 Solución al problema

El presente inventor ha llevado a cabo estudios intensivos para resolver el problema de un método convencional en el que se produce una reacción no específica después de un lapso de tiempo determinado en un método inmunocromatográfico de extracción y medición de un antígeno de cadena de azúcar mediante extracción con ácido nitroso en una pieza de prueba inmunocromatográfica.

15 Los presentes inventores han encontrado que, en el método convencional, un reactivo neutralizante es consumido completamente por un ácido que permanece corriente arriba de una pieza de prueba inmunocromatográfica después de un lapso de tiempo determinado, de modo que se acidifica toda la solución de revelado en la pieza de prueba inmunocromatográfica, provocando en consecuencia una reacción no específica.

20 Por lo tanto, los presentes inventores han considerado que un ácido usado en la extracción de ácido nitroso se neutraliza de manera confiable y continua con un reactivo neutralizante en una pieza de prueba inmunocromatográfica, o que un ácido que permanece corriente arriba de una pieza de prueba inmunocromatográfica se mantiene en la porción corriente arriba y evita que alcance una región de detección donde se produce una reacción antígeno-anticuerpo.

25 Los presentes inventores han descubierto que un material que es una tela tejida que tiene un peso base de 10 a 400 g/m² y un espesor de 0.1 a 2.0 mm, es altamente absorbible, tiene alta retención de agua y es capaz de liberar continuamente un agente neutralizante durante un largo período de tiempo (1 hora o más) se usa como material poroso en una región impregnada con un reactivo neutralizante, y mediante el uso de dicho material, se puede mantener una capacidad de neutralización suficiente incluso cuando se desarrolla un ácido en pequeñas porciones en una porción corriente abajo de una tira de prueba después de un lapso de tiempo determinado (por ejemplo, en o después de 5 minutos, que es el tiempo del juicio), de modo que se suprime una reacción no específica. Los presentes inventores han encontrado además que en el caso de usar un filtro de vidrio altamente absorbible, que retiene agua y poca capacidad de liberación, un ácido impregnado en una almohadilla de muestra se mueve a una almohadilla de neutralización después de un lapso de tiempo determinado, y luego se libera de la región y, por lo tanto, evita que llegue a una región de detección donde se produce una reacción antígeno-anticuerpo, de modo que se suprime una reacción no específica en un caso negativo, y se evita el desarrollo del color de una línea en el momento del juicio o después, en una muestra positiva en o alrededor de la sensibilidad de detección mínima, completando así la presente invención.

Específicamente, la presente invención incluye los siguientes aspectos.

45 [1] De acuerdo con la invención, se proporciona una pieza de prueba inmunocromatográfica para extraer y medir un antígeno de cadena de azúcar en una muestra, comprendiendo la pieza de prueba inmunocromatográfica: una almohadilla de muestra a la que se agrega una muestra mezclada con nitrito o una solución ácida; una región marcadora que comprende un anticuerpo marcado obtenido marcando un anticuerpo contra el antígeno de la cadena de azúcar; y una región de detección sobre la que se inmoviliza el anticuerpo contra el antígeno de la cadena de azúcar, en donde se forma un complejo anticuerpo marcado con antígeno de la cadena de azúcar-anticuerpo en la región de detección para medir el antígeno de la cadena de azúcar, y la pieza de prueba inmunocromatográfica que tiene una región impregnada con un reactivo neutralizante corriente arriba de la región marcadora, y que además tenga una región impregnada con un reactivo ácido sólido cuando se utilice la muestra mezclada con el nitrito, o una región impregnada con nitrito cuando se utilice la muestra mezclada con la solución ácida, corriente arriba de la región impregnada con el reactivo neutralizante, en donde

55 un material para la región impregnado con el reactivo neutralizante que tiene tres propiedades de ser altamente absorbible, con alta capacidad de retención de agua y tener poca capacidad de liberación o capacidad de liberación continua, y

60 debido a la propiedad de alta absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar está suficientemente neutralizada, y debido a la baja propiedad de liberación o la propiedad de liberación sostenida de la región impregnada con el reactivo de neutralización, se evita que una solución ácida restante llegue a la región de detección, o se revela continuamente una solución de prueba suficientemente neutralizada hasta la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica.

65

De acuerdo con la invención, el material para la región impregnada con el reactivo neutralizante es una tela tejida que tiene un peso base de 10 a 400 g/m² y un espesor de 0.1 a 2.0 mm.

De acuerdo con la invención, la tela tejida absorbe agua en una cantidad de 10 a 100 µl/cm² por cm/m², tiene una velocidad de absorción de agua de 1.0 a 5.0 µl/seg, retiene agua en una cantidad de 10 a 100 µl/cm² tras un fragmento de 1 cm/m² se permite que entre en contacto con la región de detección en estado húmedo y se deja reposar durante 5 minutos, y tiene un área de dispersión de líquido de 20 mm² o menor después de un fragmento de 1 cm/m² se deja entrar en contacto en estado húmedo con una membrana y se deja reposar durante 5 minutos.

[2] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con [1], en donde debido a la alta propiedad de absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar está suficientemente neutralizada, y debido a la propiedad de liberación sostenida de la región impregnada con el reactivo neutralizante, se mantiene una capacidad de neutralización suficiente incluso cuando llega una solución ácida restante a la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica.

[3] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] o [2] anteriores, en donde debido a la propiedad de alta absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar está suficientemente neutralizado y, debido a la baja capacidad de liberación de la región impregnada con el reactivo neutralizante, se evita que una solución ácida restante llegue a la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica en un caso negativo, y el desarrollo de color de una línea se previene en o después del momento del juicio en un caso positivo.

[4] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [3] anteriores, en donde la región impregnada con el reactivo ácido sólido o el nitrito está presente sobre la almohadilla de muestra o sobre la almohadilla con la región marcadora aplicada a la misma.

[5] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [4] anteriores, en donde el reactivo ácido sólido se selecciona del grupo que consiste en ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido cítrico y ácido tartárico.

[6] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [5] anteriores, en donde el reactivo neutralizante es tris(hidroximetil)aminometano o hidróxido de sodio.

[7] La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6] anteriores, en donde el antígeno de cadena de azúcar es el antígeno de cadena de azúcar de protozoos, hongos, bacterias, micoplasma, rickettsia, clamidia o virus.

[8] Un método para medir un antígeno de cadena de azúcar en una muestra de acuerdo con un método de inmunocromatografía utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [7] anteriores,

el método que comprende

mezclar la muestra con una solución de ácido nitroso cuando la pieza de prueba inmunocromatográfica tiene una región impregnada con un reactivo ácido sólido, o mezclar la muestra con una solución ácida cuando la pieza de prueba inmunocromatográfica tiene una región impregnada con nitrito, y agregar la mezcla a una almohadilla de muestra de la pieza de prueba inmunocromatográfica, en donde en el método inmunocromatográfico,

el antígeno de la cadena de azúcar se extrae de la muestra por la acción del ácido nitroso generado a través de una reacción del nitrito con el reactivo ácido sólido en la región impregnada con el reactivo ácido sólido o la región impregnada con el nitrito, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar se neutraliza en una región impregnada con un reactivo neutralizante, y

se forma un complejo de anticuerpo marcado con antígeno de cadena de azúcar-anticuerpo en una región de detección, y en donde

debido a la propiedad de alta absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar está suficientemente neutralizada, y debido a la baja propiedad de liberación o la propiedad de liberación sostenida de la región impregnada con el reactivo de neutralización, se evita que una solución ácida restante llegue a la región de detección, o se revela continuamente una solución de prueba suficientemente neutralizada hasta la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica.

La presente descripción incluye los contenidos como se divulga en la Solicitud de Patente Japonesa No. 2017-049155, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Efectos ventajosos de la invención

En la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención para medir un antígeno de estreptococo β-hemolítico del grupo A, que es capaz de extraer un antígeno de cadena de azúcar con ácido nitroso en la pieza de prueba inmunocromatográfica, una almohadilla, en la que un material que tiene tres propiedades de ser altamente absorbible en agua, de alta capacidad de retención en agua (retención en líquido), y poca capacidad de liberación en líquido o capacidad de liberación continua en líquido está impregnado con un reactivo neutralizante, está dispuesto en una posición corriente abajo de un sitio de extracción de antígeno y corriente arriba de un sitio de marcado. Mediante esta estructura, se puede suprimir una reacción no específica después de un lapso de tiempo.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es una vista que muestra esquemáticamente una estructura de una pieza de prueba inmunocromatográfica (pieza de prueba de una almohadilla) que tiene una región de reactivo ácido sólido y una región de reactivo neutralizante.

[Figura 2] La figura 2 es una vista que muestra esquemáticamente una estructura de una pieza de prueba inmunocromatográfica (pieza de prueba de dos almohadillas) que tiene una región de reactivo ácido sólido y una región de reactivo neutralizante.

A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

La presente invención se relaciona con una pieza de prueba inmunocromatográfica que simplifica un tratamiento de extracción de un antígeno de cadena de azúcar con ácido nitroso sobre una pieza de prueba inmunocromatográfica, de modo que el antígeno de cadena de azúcar utilizado como sustancia a detectar se puede medir con rapidez y precisión.

La pieza de prueba inmunocromatográfica se compone de un soporte que tiene una región de detección, sobre la que se inmoviliza un anticuerpo (Anticuerpo 1) que captura una sustancia a detectar (antígeno, etc.), una región marcadora que tiene un anticuerpo móvil marcado (Anticuerpo 2), una almohadilla de muestra a la que se agrega una muestra, una banda de absorción que absorbe una solución de muestra revelada, una hoja de respaldo para adherir estos miembros entre sí, y similares.

La pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención puede acomodarse en un recipiente de almacenamiento. Tal recipiente de almacenamiento puede evitar la degradación de la pieza de prueba, que es causada, por ejemplo, por los rayos ultravioleta o la humedad contenida en el aire. Además, en el caso de tratar un espécimen o una muestra que tenga contaminación o infectividad, dicho recipiente de almacenamiento puede evitar que un agente que realiza un ensayo se contamine o se infecte con el espécimen o la muestra. Por ejemplo, una caja hecha de resina que tenga un tamaño adecuado se puede utilizar como recipiente de almacenamiento, y el dispositivo de la presente invención se puede acomodar en la caja. De lo contrario, la superficie de una pieza de prueba, sobre la que se ha inmovilizado un antígeno o un anticuerpo, se puede recubrir con una película hecha de resina o similar (laminado superior). Hay un caso donde un recipiente de almacenamiento y una pieza de prueba alojada en el recipiente de almacenamiento se denominan colectivamente dispositivo inmunocromatográfico.

Cabe señalar que el número de regiones de detección y el tipo de anticuerpo marcado contenido en la región marcadora no se limitan a uno, y que, utilizando anticuerpos correspondientes a una pluralidad de sustancias a detectar, pueden medirse dos o más antígenos sobre una sola pieza de prueba.

El soporte es un material que tiene la propiedad de inmovilizar un anticuerpo utilizado para capturar una sustancia a detectar (un antígeno), y además, no impide el movimiento de un líquido en sentido horizontal. Preferiblemente, el soporte es una membrana delgada porosa (una membrana) que tiene acción capilar, y es un material capaz de transportar un líquido y componentes dispersos en el líquido de acuerdo con la absorción. El material usado para el soporte no está particularmente limitado, y los ejemplos del material incluyen celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, difluoruro de polivinilideno (PVDF), fibra de vidrio, nailon y policetona. Entre estos materiales, es más preferible una membrana fina o una membrana de nitrocelulosa. Una membrana, sobre la que se inmoviliza un anticuerpo, se denomina "membrana inmovilizada con anticuerpo".

La región marcadora consiste en un sustrato poroso que comprende un anticuerpo marcado, y una fibra de vidrio, tela no tejida y similares de uso común pueden usarse aquí como material para el sustrato. El sustrato es preferiblemente una almohadilla que tiene un grosor de aproximadamente 0.3 mm a 0.6 mm, para que el sustrato se impregne con una gran cantidad de anticuerpo marcado. Un sustrato poroso que se impregna con un anticuerpo marcado y luego se seca también se denomina almohadilla seca.

Para el marcado de un anticuerpo marcado, se utilizan en muchos casos enzimas tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, coloides metálicos tales como coloides de oro, partículas de sílice, partículas de celulosa, partículas de poliestireno coloreadas, partículas de látex coloreadas, etc. Cuando se utilizan partículas coloidales de metal o partículas coloreadas tales como partículas coloreadas de poliestireno o partículas coloreadas de látex, el color se desarrolla por aglomeración de estos reactivos de marcaje. Entonces, se mide el color así desarrollado. Las partículas en las que se inmovilizan los anticuerpos se denominan partículas inmovilizadas con anticuerpos.

La región de detección indica una región del soporte sobre la que se inmoviliza un anticuerpo utilizado para capturar una sustancia a detectar (un antígeno). En la región de detección, se establece al menos una región sobre la que se inmoviliza un anticuerpo utilizado para capturar un antígeno. La región de detección puede estar comprendida en el soporte y un anticuerpo puede estar inmovilizado sobre el soporte.

La almohadilla de muestra es un sitio al que se agrega una muestra y es un material poroso. La almohadilla de muestra es un sitio ubicado más corriente arriba de la pieza de prueba inmunocromatográfica. Como material para la almohadilla de muestra, se puede usar un filtro de uso común, fibra de vidrio, tela no tejida, etc. Para utilizar una gran cantidad de muestra en inmunoensayo, la almohadilla de muestra es preferiblemente una almohadilla que tiene un grosor de aproximadamente 0.3 mm a 1 mm. El espécimen también incluye una muestra preparada utilizando el espécimen, como una muestra obtenida suspendiendo el espécimen en otra solución.

La banda de absorción es un miembro para componentes de absorción, que se suministran al soporte y no están asociados con la reacción en la región de detección. Como material para la banda de absorción, se puede utilizar un filtro, una esponja o similar con alta retención de agua, que consta de un compuesto común natural de alto peso molecular, un compuesto sintético de alto peso molecular, etc. Con el fin de promover el revelado de una muestra, se utiliza preferentemente un material altamente absorbente de agua como banda de absorción.

La hoja de respaldo es un miembro utilizado para la adhesión y/o inmovilización de todos los materiales antes mencionados, a saber, el soporte, la almohadilla de muestra, la región de marcado, la banda de absorción y similares, en la que estos materiales se superponen parcialmente entre sí. La hoja de respaldo no se requiere necesariamente, si estos materiales se disponen e inmovilizan con intervalos óptimos. Sin embargo, en general, la hoja de respaldo se usa preferiblemente por conveniencia o facilidad de producción o uso.

En la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención, también puede estar presente una región de visualización de control (un miembro). La región de visualización de control es un sitio que muestra que una prueba se lleva a cabo con precisión. Por ejemplo, la región de visualización de control está ubicada corriente abajo de la región de detección y emite señales tales como coloración, cuando una muestra pasa a través de la región de detección y llega a la región de visualización de control. En la región de visualización de control, una sustancia que se enlaza a un anticuerpo enlazado a un portador marcado puede estar en fase sólida, o un reactivo como un indicador de pH, cuyo color cambia cuando llega una muestra, también puede estar en fase sólida. Cuando dicho anticuerpo enlazado a un portador marcado es un anticuerpo monoclonal de ratón, se puede usar un anticuerpo IgG anti-ratón.

El tamaño de una pieza de prueba inmunocromatográfica no está limitado. Por ejemplo, su altura es de varios cm a más de diez y menos de 20 cm, y su ancho es de aproximadamente varios mm a varios cm.

En la pieza de prueba que tiene la forma descrita anteriormente, la muestra se pasa a través de un canal de flujo poroso formado conectando una serie de miembros, como la almohadilla de muestra, la región de marcado, el soporte, la región de detección, la banda de absorción y similares, uno con el otro. En consecuencia, en la presente realización, todos estos componentes constituyen una región de movimiento de la muestra. También puede haber una realización en la que la muestra no penetre en diversos materiales constitucionales, sino que pase a través de la interfase, dependiendo de los materiales o formas de los materiales constitucionales. Sin embargo, dado que la región de movimiento de la muestra definida en la presente descripción es irrelevante para que la muestra pase al material o a través de la interfase, la pieza de prueba que tiene la realización mencionada anteriormente también está incluida en el alcance de la presente descripción.

En el caso de medir un antígeno de cadena de azúcar en una muestra utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención, es necesario extraer primero el antígeno de cadena de azúcar en la muestra. La extracción del antígeno de la cadena de azúcar se realiza tratando la muestra que contiene el antígeno de la cadena de azúcar con ácido nitroso. El ácido nitroso puede generarse mezclando nitrito tal como nitrito de sodio con un ácido, y la muestra que contiene el antígeno de la cadena de azúcar puede tratarse con el ácido nitroso así generado. El antígeno extraído se enlaza a través de una reacción antígeno-anticuerpo al anticuerpo inmovilizado sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica. A este respecto, el sistema de reacción se vuelve fuertemente ácido si queda ácido nitroso en el sistema de reacción, de modo que se inhibe la reacción antígeno-anticuerpo. Por tanto, es necesario neutralizar el ácido nitroso en el sistema de reacción.

En el método de medir un antígeno de cadena de azúcar mezclando nitrito con un ácido para generar ácido nitroso, extrayendo el antígeno de cadena de azúcar de una muestra con el ácido nitroso, neutralizando el ácido nitroso y luego permitiendo que el antígeno de cadena de azúcar se enlace al anticuerpo inmovilizado sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica, de acuerdo con la presente invención, los ejemplos del método de extracción y medición del antígeno de la cadena de azúcar incluyen los siguientes métodos. En cualquiera de los métodos, la extracción del antígeno de la cadena de azúcar con ácido nitroso y la neutralización se realizan sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica. Para realizar la extracción del antígeno de la cadena de azúcar con ácido nitroso sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica, la pieza de prueba inmunocromatográfica se puede impregnar con un reactivo ácido o nitrito. Para realizar la neutralización de la pieza de prueba inmunocromatográfica, la pieza de prueba inmunocromatográfica se puede impregnar con un reactivo neutralizante.

(A) Una muestra se mezcla previamente con una solución ácida y la mezcla se agrega a una almohadilla de muestra de la pieza de prueba inmunocromatográfica impregnada con nitrito y un reactivo neutralizante. Cuando la solución mixta llega a la región impregnada con el nitrito, el nitrito reacciona con el ácido para generar ácido nitroso, de modo que se extrae un antígeno de cadena de azúcar en la muestra. El extracto del antígeno de la cadena de azúcar se

neutraliza en la región impregnada con el reactivo neutralizante sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica, y el antígeno de la cadena de azúcar se enlaza al anticuerpo inmovilizado sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica y así puede detectarse. En este método, los ejemplos de la solución ácida utilizada incluyen ácido acético, ácido clorhídrico, ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido cítrico y ácido tartárico.

5 (B) Una muestra se mezcla previamente con una solución de nitrito y la mezcla se agrega a una almohadilla de muestra de la pieza de prueba inmunocromatográfica impregnada con un reactivo ácido y un reactivo neutralizante. Cuando la solución mixta llega a la región impregnada con el reactivo ácido, el nitrito reacciona con el ácido para generar ácido nitroso, de modo que se extrae un antígeno de cadena de azúcar en la muestra. El extracto del antígeno de la cadena de azúcar se neutraliza en la región impregnada con el reactivo neutralizante sobre la pieza de prueba
10 inmunocromatográfica neutralizante, y el antígeno de la cadena de azúcar se enlaza al anticuerpo inmovilizado sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica y así puede detectarse.

En la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención para realizar el método (A) o (B) descrito anteriormente, el reactivo ácido o el nitrito y el reactivo neutralizante se impregnan corriente arriba de la región de
15 marcado (en el lado corriente arriba a lo largo del flujo de la muestra, donde está presente la almohadilla de muestra), es decir, dentro de la almohadilla de muestra o entre la almohadilla de muestra y la región de marcado. La pieza de prueba inmunocromatográfica, en la que el nitrito y el reactivo neutralizante están impregnados dentro de la almohadilla de muestra o entre la almohadilla de muestra y la región de marcado, puede usarse en el método (A) descrito anteriormente. Además, la pieza de prueba inmunocromatográfica, en la que el reactivo ácido y el reactivo
20 neutralizante están impregnados dentro de la almohadilla de muestra o entre la almohadilla de muestra y la región de marcado, puede usarse en el método (B) descrito anteriormente. Cabe señalar que como reactivo ácido se utiliza un reactivo ácido sólido. De acuerdo con estos métodos, una sustancia a detectar en una muestra de prueba se puede medir de forma precisa y específica, independientemente de la cantidad de la muestra de prueba sometida a una
25 prueba.

El reactivo ácido sólido o el nitrito pueden impregnarse en la almohadilla de muestra, o pueden impregnarse en una almohadilla hecha de un material poroso que sea diferente de la almohadilla de muestra, como una tela no tejida, y el material poroso impregnado con reactivo ácido sólido obtenido o el material poroso impregnado con nitrito puede disponerse entre la almohadilla de muestra y la región de marcado, es decir, en el lado corriente arriba de la región de
30 marcado. Aquí, la región impregnada con el reactivo ácido sólido o el nitrito puede ponerse en contacto o no con la almohadilla de muestra o la región de marcado.

En la presente invención, la región impregnada con un reactivo también se denomina como almohadilla impregnada con un reactivo.

35 El reactivo de neutralización se dispone corriente abajo de la región impregnada con el reactivo ácido sólido o el nitrito. El reactivo neutralizante se puede impregnar en la almohadilla de muestra, o se puede impregnar en el soporte, o se puede impregnar en una almohadilla hecha de un material poroso que es diferente del soporte, como una tela no tejida (como el nailon) y una tela, y el material poroso impregnado con reactivo neutralizante obtenido puede disponerse
40 entre la región impregnada con el reactivo ácido sólido o el nitrito y la región de marcado. Es decir, la pieza de prueba inmunocromatográfica tiene una región impregnada con un reactivo neutralizante corriente arriba de la región de marcado, y además tiene una región impregnada con un reactivo ácido sólido o nitrito corriente arriba de la región impregnada con el reactivo neutralizante.

45 El material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante incluye un material poroso que es una tela tejida que tiene un peso base de 10 a 400 g/m² y un espesor de 0.1 a 2.0 mm, absorbe agua en una cantidad de 10 a 100 μl/cm² por cm/m², tiene una velocidad de absorción de agua de 1.0 a 5.0 μl/seg, retiene agua en una cantidad de 10 a 100 μl/cm² tras un fragmento de 1 cm/m² se permite que en estado húmedo entre en contacto con una membrana y se deja reposar durante 5 minutos, y preferiblemente tiene un área de dispersión de líquido de 20
50 mm² o menor después de un fragmento de 1 cm/m² se permite que entre en contacto con una membrana en estado húmedo y se deja reposar durante 5 minutos, a saber, tiene tres propiedades de ser altamente absorbible en agua, tener alta retención en agua (retención en líquido) y tener poca capacidad de liberación en líquido o capacidad de liberación continua en líquido. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen un filtro hecho de fibra de algodón de celulosa y un filtro de vidrio hecho de fibra de vidrio. Los ejemplos de dicho filtro incluyen el No. 26-3 de Toyo Roshi
55 Kaisha, Ltd. Además, el filtro que se utilizará tiene una gran capacidad y puede retener suficientemente una solución ácida que llega al filtro más tarde que una muestra de la porción corriente arriba. Usando tal material poroso, el reactivo neutralizante puede impregnarse en él en una cantidad que puede neutralizar suficientemente una muestra de la que se ha extraído un antígeno de cadena de azúcar con ácido nitroso generado a través de una reacción de nitrito con el reactivo ácido. Además, la almohadilla puede absorber y retener una gran cantidad de líquido y mantiene la propiedad
60 de liberación. Por lo tanto, si se revela un líquido que contiene ácido nitroso que permanece corriente arriba de la pieza de prueba inmunocromatográfica en el momento del juicio o después, la almohadilla puede tener una capacidad de neutralización suficiente y puede evitar que la solución ácida llegue a la región de detección sobre la que se encuentra el anticuerpo inmovilizado. Como resultado, se suprime una reacción no específica y el antígeno de la cadena de azúcar puede detectarse sin causar la reacción no específica. Por otro lado, los ejemplos específicos del filtro de vidrio altamente absorbente de agua, alta retención de agua y de baja capacidad de liberación incluyen GS-25 de Toyo
65 Roshi Kaisha, Ltd., que se puede impregnar con una mayor cantidad de reactivo neutralizante debido a la alta

propiedad de absorción de agua, y evita que la solución ácida llegue a la región de detección inmovilizada debido a la propiedad de alta retención de agua y la propiedad de baja liberación de agua. Como resultado, se puede suprimir una reacción no específica en un caso negativo y se puede prevenir el revelado de color de una línea en el momento del juicio o después en un caso positivo.

5 El "peso base" del material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante es de 10 a 400 g/m². Aquí, el "peso base" indica un peso por unidad de área (1 m²) de una tela o similar. El peso base se puede cambiar apropiadamente ajustando la cantidad o composición del reactivo neutralizante impregnado sobre la almohadilla. Si el peso base es de 30 g/m² o menos, el material poroso tiene una alta porosidad y se rasga fácilmente cuando se
10 impregna con el reactivo neutralizante y, por lo tanto, es difícil de manipular durante la producción inmunocromatográfica. Por lo tanto, el peso base es preferentemente de 50 g/m² o más. Si el peso base es de 300 g/m² o más, el material poroso tiene una porosidad baja y no permite la penetración uniforme de una muestra en el material, aunque depende de la composición del reactivo neutralizante, de modo que la muestra no se puede mezclar con el reactivo neutralizante. Por lo tanto, el peso base es preferentemente de 300 g/m² o menos. El peso base es lo
15 más preferiblemente de 250 a 270 g/m².

El "espesor" del material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante es preferentemente de 0.1 a 2.0 mm. El espesor se puede cambiar adecuadamente ajustando la cantidad o composición del reactivo neutralizante impregnado en la almohadilla. Si el espesor es de 0.4 mm o menos, el material poroso se rasga
20 fácilmente cuando se impregna con el reactivo neutralizante y, por lo tanto, es difícil de manipular durante la producción inmunocromatográfica. Por tanto, el espesor es preferentemente de 0.4 a 0.8 mm y más preferentemente de aproximadamente 0.6 mm considerando la facilidad con la que se ajusta la cantidad de reactivo neutralizante impregnado y la facilidad de manipulación durante la producción inmunocromatográfica.

25 La propiedad de "absorción de agua" es de 10 a 100 µl/cm² en términos de una cantidad de agua absorbida por cm², y de 1.0 a 5.0 µl/seg en términos de una velocidad de absorción de agua. La cantidad de agua absorbida y la velocidad de absorción de agua se determinan preparando 200 µl de una solución coloreada (Tween 20 al 1 % + Rojo No. 102) en una celda de una placa EIA de 96 pozos, colocando en ella una pieza de ensayo, en la que un material que tiene un tamaño de 5 × 60 mm se adhiere a una hoja de soporte, midiendo el tiempo que tarda la solución en llegar al
30 extremo superior de la pieza de prueba (un extremo de la pieza de prueba sumergido en la solución se define como un extremo inferior), además, sacar la pieza de prueba de la solución inmediatamente después de que la solución alcance el extremo superior y medir la cantidad de líquido que queda en la celda. La cantidad de agua absorbida es la cantidad de un líquido que se calcula restando la cantidad del líquido que queda en la celda de 200 µl y dividiendo el valor obtenido por 1 cm² del área del material. La velocidad de absorción de agua se determina de acuerdo con la
35 cantidad de agua absorbida/el tiempo necesario para alcanzar el extremo superior. El material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante es preferentemente un material que tenga una mayor cantidad de agua absorbida y una velocidad de absorción de agua más lenta. Si la cantidad de agua absorbida es de 30 µl/cm² o menos, aunque dependiendo de la concentración y contenido de agua del reactivo ácido sólido, se considera que la cantidad de reactivo neutralizante impregnado puede ser inferior a la cantidad necesaria para la pieza de prueba
40 inmunocromatográfica. En concreto, la cantidad de agua absorbida es preferentemente de 30 µl/cm² o más. La velocidad de absorción de agua del material poroso que se utilizará en la región impregnada con el reactivo neutralizante influye en el tiempo requerido para extraer un antígeno de cadena de azúcar de una muestra y el tiempo requerido para neutralizar una solución de prueba después de la extracción. El tiempo requerido para extraer un antígeno de la cadena de azúcar se puede ajustar hasta cierto punto, pero no completamente, ajustando el material o
45 la composición del reactivo ácido sólido. Por tanto, la velocidad de absorción de agua del material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante es un factor importante para la extracción suficiente del antígeno de la cadena de azúcar y la neutralización. Específicamente, la velocidad de absorción de agua es preferentemente de 1.0 a 5.0 µl/seg. La velocidad de absorción de agua es más preferiblemente de 2.0 µl/seg o menos.

50 La propiedad de "retención de agua" se determina colocando sobre una membrana un fragmento de 1 cm² obtenido del material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante, adicionándole 70 µl de una solución (Tween 20 al 1 % + Rojo No. 102), y midiendo el peso de la membrana antes y después de dejar reposar la membrana durante 5 minutos. La cantidad de líquido para la propiedad de retención de agua varía según la composición (un tensoactivo o una proteína) de la solución que se va a añadir. En el caso de una prueba con una solución de Tween
55 20 al 1 %, la cantidad de agua retenida es preferentemente de 10 a 100 µl/cm². La cantidad de agua retenida es más preferentemente de 15 µl/cm² o más.

La propiedad "capacidad de liberación" se mide colocando sobre una membrana un fragmento de 1 cm² obtenido a partir del material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante, añadiéndole 70 µl de una
60 solución (Tween 20 al 1 % + Rojo No. 102), y determinando el área de un líquido esparcido sobre la membrana después de que la membrana se deja reposar durante 5 minutos. El área varía según la composición (un tensoactivo o una proteína) de la solución a añadir. En el caso de una prueba con una solución de Tween 20 al 1 %, el área es de 30 mm² o menos. La propiedad capacidad de liberación es más preferiblemente de 20 mm² o menos como esta área.

65 Aquí, la región impregnada con el reactivo neutralizante y la región impregnada con el reactivo ácido sólido o nitrito o la región de marcado pueden o no estar en contacto entre sí.

La región impregnada con el reactivo ácido sólido se denomina región de reactivo ácido sólido, la región impregnada con el nitrito se denomina región de nitrito y la región impregnada con el reactivo neutralizante se denomina región de reactivo neutralizante o región de reactivo básica.

5 La pieza de prueba inmunocromatográfica que tiene una región de reactivo de ácido sólido o una región de nitrito y una región de reactivo neutralizante tiene, sobre el soporte, una almohadilla de muestra, una región de reactivo de ácido sólido o una región de nitrito, una región de reactivo neutralizante, una región de marcado, una región de detección y una banda de absorción corriente arriba de la misma, y la región de reactivo ácido sólido o la región de nitrito pueden ubicarse sobre la almohadilla de muestra. Además, la almohadilla de muestra, la región de reactivo ácido sólido o la región de nitrito, la región de reactivo neutralizante, la región de marcado, la región de detección y la banda de absorción pueden ponerse en contacto o no con una región adyacente a la misma. Además, la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito, la región del reactivo neutralizante y la región de marcado no están necesariamente impregnadas en cada material poroso diferente, y una pluralidad de o todas las regiones pueden impregnarse en un solo material poroso.

El reactivo ácido sólido utilizado en la presente invención se encuentra en estado sólido a temperatura normal y no se volatiliza a temperatura elevada.

20 Los ejemplos del reactivo ácido sólido que se usa preferiblemente en la presente invención pueden incluir ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido cítrico y ácido tartárico.

Si se usa un ácido con una valencia más alta, por ejemplo, ácido cítrico, como reactivo ácido sólido preferido en la presente invención, la extracción se puede realizar con una cantidad menor de ácido. Por otro lado, si la valencia de un ácido es la misma, por ejemplo, ácido maleico o ácido tartárico que tienen una constante de disociación ácida más pequeña, es más eficiente.

Además, el reactivo ácido sólido utilizado en la presente invención es preferentemente un reactivo que no se colorea en la pieza de prueba inmunocromatográfica, y más específicamente, un reactivo que tiene color blanco en estado seco o apenas se colorea por calor seco u oxidación.

Los ejemplos del nitrito usado en la presente invención incluyen nitrito de sodio y nitrito de potasio.

35 La cantidad del reactivo ácido sólido o el nitrito usado en la presente invención, es decir, la cantidad del reactivo ácido sólido o el nitrito impregnado en la pieza de prueba inmunocromatográfica no está particularmente limitada. En general, la cantidad del reactivo ácido sólido o el nitrito es de aproximadamente 0.01 μg a 1 mg, y es preferiblemente de aproximadamente 0.1 μg a 0.1 mg, con respecto a una única pieza de prueba inmunocromatográfica. Sin embargo, es preferible seleccionar una cantidad óptima, en la que se puedan obtener efectos según el tipo de reactivo ácido sólido o el nitrito a utilizar, la composición de la suspensión de muestra, la cantidad añadida, etc.

40 Para impregnar una almohadilla de muestra o un material poroso con el reactivo ácido sólido o el nitrito, el reactivo ácido sólido o el nitrito se disuelve una vez en una solución, y la solución obtenida se aplica luego a la almohadilla de muestra o al material poroso y luego se seca.

45 El reactivo neutralizante utilizado en la presente invención se encuentra en estado sólido a temperatura normal y no se volatiliza a temperatura elevada.

Ejemplos del reactivo neutralizante que se usa preferiblemente en la presente invención incluyen base Tris (tris(hidroximetil)aminometano), hidróxido de sodio, hidrogenofosfato dipotásico, citrato trisódico y un regulador de Good que tiene una capacidad reguladora en el intervalo alcalino.

50 La cantidad del reactivo neutralizante utilizado en la presente invención, es decir, la cantidad del reactivo neutralizante impregnado en la pieza de prueba inmunocromatográfica, no está particularmente limitada. En general, el reactivo neutralizante se usa en una cantidad de aproximadamente 0.01 μg a 1 mg, y preferiblemente de aproximadamente 0.1 μg a 0.1 mg, para una única pieza de prueba inmunocromatográfica. Sin embargo, es preferible seleccionar una cantidad óptima, en la que se puedan obtener efectos según el tipo de reactivo neutralizante utilizado, la composición de la suspensión de la muestra, la cantidad añadida, etc.

60 Para impregnar una almohadilla de muestra o un material poroso con el reactivo neutralizante, el reactivo neutralizante puede disolverse una vez en una solución, la solución obtenida puede aplicarse luego a la almohadilla de muestra o al material poroso y, posteriormente, puede secarse.

65 La figura 1 y la figura 2 son vistas donde cada una muestra una realización preferida de una pieza de prueba inmunocromatográfica típica. La pieza de prueba inmunocromatográfica que se muestra en la figura 1 o la figura 2 es una pieza de prueba inmunocromatográfica impregnada con un reactivo ácido sólido y un reactivo neutralizante. Sin embargo, se puede impregnar nitrato en lugar del reactivo ácido sólido, y el resultado es una pieza de prueba

inmuncromatográfica impregnada con nitrato y un reactivo neutralizante. Las personas experimentadas en la técnica pueden diseñar y producir adecuadamente una pieza de prueba inmuncromatográfica impregnada con nitrato y un reactivo neutralizante. Cabe señalar que la pieza de prueba inmuncromatográfica no se limita a las que se muestran en la figura 1 y la figura 2. En la figura 1 y la figura 2, el número de referencia 1 indica un soporte, el número de referencia 2 indica una región de marcado, el número de referencia 3 indica una región de detección, el número de referencia 4 indica una almohadilla de muestra, el número de referencia 7 indica una banda de absorción y el número de referencia 8 denota una hoja de respaldo. Además, un laminado superior puede adherirse sobre toda la pieza de prueba.

La figura 1A y la figura 2A son vistas desde arriba, y la figura 1B y la figura 2B son vistas transversales. En el ejemplo que se muestra en la figura 1, un soporte 1 sobre el que se forma una región 3 de detección, una banda 7 de absorción, una región 2 de marcado, una almohadilla 4 de muestra y similares, se laminan sobre una hoja 8 de respaldo hecha de resina o similares. Como se muestra en la figura 1, un extremo de la banda 7 de absorción está laminado sobre un extremo del soporte 1, el otro extremo del soporte 1 está laminado en un extremo de la región 2 de marcado y el otro extremo de la región 2 de marcado está laminado en un extremo de la almohadilla 4 de muestra. Una porción corriente arriba de la almohadilla 4 de muestra está impregnada con un reactivo ácido sólido, y una parte corriente abajo de la almohadilla de muestra está impregnada con un reactivo neutralizante, que está algo apartado de la parte corriente arriba. La región impregnada con el reactivo ácido sólido se denomina región 5 de reactivo ácido sólido, y la región impregnada con el reactivo neutralizante se denomina región 6 de reactivo neutralizante. En esta pieza de prueba, la almohadilla de muestra también sirve como una región 5 de reactivo de ácido sólido y una región 6 de reactivo de neutralización. Es decir, la región del reactivo de ácido sólido y la región del reactivo de neutralización están presentes sobre la almohadilla de muestra. Esta pieza de prueba, en la que la región del reactivo de ácido sólido y la región del reactivo de neutralización se establecen como un material poroso (almohadilla), también se denomina pieza de prueba de una sola almohadilla. En el ejemplo que se muestra en la figura 2, la región 5 del reactivo ácido sólido y/o la región 6 del reactivo neutralizante están corriente arriba de la región 2 de marcado, y se superponen entre sí, de modo que se genera un canal de flujo de un flujo lateral continuo. En la pieza de prueba que se muestra en la figura 2, la región 5 de reactivo de ácido sólido también sirve como almohadilla de muestra. Es decir, la región del reactivo ácido sólido está presente sobre la almohadilla de muestra. En esta pieza de prueba, en la que la región del reactivo de ácido sólido y la región del reactivo de neutralización se establecen como dos materiales porosos diferentes (almohadillas), también se denomina pieza de prueba de dos almohadillas. Una almohadilla de muestra puede estar presente además corriente arriba de la región de reactivo de ácido sólido. En la pieza de prueba que se muestra en la figura 2, la región 5 del reactivo ácido sólido y la región 6 del reactivo de neutralización están impregnadas en materiales porosos diferentes. Sin embargo, sobre un solo material poroso (almohadilla), la región 5 del reactivo de ácido sólido se establece en una porción corriente arriba, y la región 6 del reactivo de neutralización se establece en una porción corriente abajo, como en la almohadilla de muestra de la pieza de prueba que se muestra en la figura 1.

Se describirá un método de uso de la pieza de prueba de la presente invención en base a la forma que se muestra en la figura 1. El siguiente método de uso es un método de mezclar una muestra con una solución de ácido nitroso y llevar a cabo la medición mediante el uso de un método de inmuncromatografía, en el que se impregnan un reactivo ácido sólido y un reactivo neutralizante. Un método para mezclar una muestra con una solución ácida y llevar a cabo la medición mediante el uso de un método de prueba de inmuncromatografía, en el que se impregnan nitrito y un reactivo neutralizante, también se puede realizar con referencia a la descripción del siguiente método de uso.

Un espécimen o una muestra preparada usando el espécimen se pone en contacto y se mezcla con una solución de nitrito, y el espécimen se suspende en la solución de nitrito, y luego la suspensión se agrega al puerto de adición de espécimen del dispositivo, para que se inicie la medición. Esta vez, se pueden mezclar de 5 a 100 μL de una muestra con 0.01 a 2 mL de nitrito 0.1 M a 8 M, y luego se pueden agregar de 5 a 200 μL de la mezcla al puerto de adición. Los ejemplos del nitrito incluyen nitrito de sodio y nitrito de potasio.

Una muestra que contiene un antígeno de cadena de azúcar como sustancia a detectar, que se somete a una almohadilla 4 de muestra, se revela hasta una región 5 de reactivo ácido sólido y una región 6 de reactivo neutralizante sobre la almohadilla 4 de muestra de acuerdo con la acción capilar y además, se revela sucesivamente hasta una región 2 de marcado, un soporte 1 y una banda 7 de absorción en la dirección horizontal. En la región 5 de reactivo de ácido sólido, el nitrito mezclado con la muestra reacciona con un reactivo de ácido sólido sobre la región 5 de reactivo de ácido sólido para generar ácido nitroso libre, de modo que se extrae un antígeno de cadena de azúcar de la muestra por la acción del ácido nitroso. El antígeno de la cadena de azúcar extraído se revela y se mueve, junto con una solución de revelado ácida, a la región 6 del reactivo neutralizante, y el pH de la solución de revelado ácida que contiene el antígeno de la cadena del azúcar se neutraliza en la región 6 del reactivo neutralizante, de modo que sea ajustado al intervalo neutral. Como resultado, el antígeno de la cadena de azúcar se revela aún más y se traslada a la región corriente abajo bajo condiciones neutras. En la región 2 de marcado, con el desarrollo de una muestra, un anticuerpo marcado se libera en el líquido y luego se revela hasta el soporte 1. Cuando un antígeno de cadena de azúcar está presente en una muestra, el antígeno de cadena de azúcar es capturado específicamente por un anticuerpo de captura en una región 3 de detección en el soporte 1, y el antígeno de cadena de azúcar también tiene una reacción específica con un anticuerpo marcado para formar un complejo. De este modo, en la región 3 de detección, se logra el sándwich del anticuerpo a través del antígeno de cadena de azúcar, de modo que se puede medir un complejo de antígeno de cadena de azúcar-anticuerpo marcado en la región 3 de detección.

De acuerdo con el método que utiliza la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención, dado que la extracción de un antígeno de cadena de azúcar de una muestra se lleva a cabo sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica, no es necesario extraer previamente el antígeno de cadena de azúcar de la muestra antes de la medición utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica, pero el antígeno de la cadena de azúcar en la muestra se puede medir en una sola etapa.

En el método de la presente invención, una muestra biológica utilizada como espécimen no está particularmente limitada. Los ejemplos de una muestra biológica de este tipo incluyen fluidos corporales y similares tales como suero, plasma, sangre, orina, heces, saliva, fluido tisular, fluido espinal o hisopo, y un producto diluido del mismo.

En el método que utiliza un dispositivo inmunocromatográfico de la presente invención, una sustancia a detectar como un analito es un antígeno de cadena de azúcar, que puede medirse mediante un inmunoensayo, es decir, un ensayo que utiliza una reacción antígeno-anticuerpo. Un ejemplo del antígeno es un polisacárido que es un antígeno de cadena de azúcar presente en la pared celular de bacterias extraídas mediante un tratamiento de extracción con ácido nitroso. También se pueden medir protozoos, hongos, bacterias, micoplasmas, rickettsias, clamidias, virus y otros que comprenden la sustancia antes mencionada. De acuerdo con el método que utiliza una pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención, puede confirmarse si la muestra biológica de un sujeto contiene o no un antígeno de cadena de azúcar derivado de protozoos, hongos, bacterias, micoplasma, rickettsia, clamidia, virus, etc. Cuando dicho antígeno de cadena de azúcar está contenido en la muestra biológica, se puede determinar que el sujeto está afectado por una infección causada por protozoos, hongos, bacterias, micoplasma, rickettsia, clamidia, virus, etc. Por ejemplo, estreptococo β -hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), se puede detectar la presencia o ausencia de infección por *Escherichia coli*, Legionella, Campylobacter, etc.

Para permitir que una muestra de la que se haya extraído un antígeno de la cadena de azúcar con ácido nitroso generado a través de una reacción de nitrito con un ácido, se absorba en una almohadilla impregnada con un reactivo neutralizante y permanezca en la almohadilla el tiempo suficiente para neutralizar la muestra de manera confiable, puede establecerse corriente arriba de un sitio de marcado un miembro en reemplazo de un filtro o un filtro de vidrio, que tiene características físicas y propiedades para controlar el revelado de una solución de muestra sobre la pieza de prueba inmunocromatográfica. Es decir, en la presente invención, el material poroso a utilizar en la región impregnada con el reactivo neutralizante puede ser pretratado de acuerdo con la necesidad. Con el fin de controlar el grado de hidrofiliicidad o el grado de hidrofobicidad, puede procesarse un material que tenga características físicas o propiedades distintas a las mencionadas anteriormente en el intervalo de características físicas o propiedades descritas en la presente invención permitiendo que el reactivo neutralizante contenga diversos fármacos o polvos. Los ejemplos del fármaco que se va a contener incluyen tensioactivos, proteínas, resinas y polímeros sintetizados químicamente. Los ejemplos del miembro que puede estar provisto de características similares a las de un filtro o un filtro de vidrio incluyen telas no tejidas como el nailon.

En la presente invención, cuando la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito y la región del reactivo neutralizante se superponen y se ponen en contacto entre sí, se establece una hoja impermeable a un líquido de tal manera que la hoja está en sándwich entre la región del reactivo ácido sólido o la región de nitrito y la región del reactivo neutralizante. El establecimiento de la hoja puede producir los siguientes tres efectos.

(A) El movimiento de un reactivo entre dos regiones adyacentes se puede suprimir durante la conservación de la pieza de prueba. Como resultado, se puede evitar la reacción de un reactivo ácido sólido o nitrito con un reactivo neutralizante por contacto. Como resultado, se puede mejorar la estabilidad del reactivo.

(B) Cuando se agrega una muestra mezclada con nitrito o un reactivo ácido, se puede evitar la extracción insuficiente de un antígeno de la cadena de azúcar atribuible a la muestra que alcanza la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito e inmediatamente después se mueve a la región del reactivo neutralizante. Es decir, se reduce la rata a la que un líquido que contiene la muestra se mueve desde la región de reactivo ácido sólido o la región de nitrito a la región de reactivo neutralizante, y se alarga el tiempo durante el cual el líquido que contiene la muestra permanece en la región de reactivo ácido sólido o la región de nitrito. Como resultado, se extrae lo suficiente un antígeno de la cadena de azúcar y se mejora la sensibilidad de la medición.

(C) Cuando se agrega una muestra mezclada con nitrito o un reactivo ácido, se puede evitar que un líquido que contiene el espécimen que haya alcanzado la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito e inmediatamente después se haya movido a la región del reactivo neutralizante fluya de regreso a la región de reactivo ácido sólido o la región de nitrito, reduciendo la actividad del reactivo ácido sólido o el nitrito, y reduciendo la eficiencia de extracción. Es decir, se evita que un líquido que contiene la muestra que ha alcanzado una vez la región del reactivo neutralizante fluya hacia atrás a la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito y se evita que reduzca la actividad del reactivo ácido sólido o el nitrito. Por lo tanto, se permite que la extracción del antígeno de la cadena de azúcar con ácido nitroso se lleve a cabo de manera eficiente y se mejora la sensibilidad de la medición.

El material de la hoja que se va a establecer entre la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito y la región del reactivo neutralizante no está limitado siempre que el material sea impermeable a un líquido. Por ejemplo, se puede utilizar una hoja hecha de resina tal como una hoja de PET (tereftalato de polietileno) o una hoja de polietileno. La hoja hecha con resina también se denomina película hecha con resina.

La hoja se puede establecer de manera que la región del reactivo ácido sólido o la región de nitrito y la región del reactivo neutralizante estén parcialmente en contacto y superpuestas entre sí. En este caso, la longitud de la porción superpuesta entre la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito y la región del reactivo neutralizante se minimiza preferiblemente y es, por ejemplo, de 5 mm o menos, preferiblemente de 3 mm o menos, más preferiblemente de 2 mm o menos.

La hoja se puede establecer de manera que no permita que la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito y la región del reactivo neutralizante entren en contacto entre sí, y la almohadilla impregnada con el reactivo ácido o el nitrito puede tener una forma que sobresale de una hoja de PET. En este caso, la región de neutralización se puede recubrir completamente con la hoja, y la región de reactivo ácido sólido o la región de ácido nitroso se pueden establecer sobre la hoja. En este caso, un líquido dentro de la región del reactivo de ácido sólido o la región del ácido nitroso fluye sobre la hoja sin moverse directamente a la región de neutralización y luego llega a la región del reactivo de neutralización.

La hoja puede establecerse, por ejemplo, sólo entre la región del reactivo ácido sólido o la región del nitrito y la región del reactivo neutralizante. Por otro lado, cuando la hoja hecha con resina se adhiere a, como hoja laminada superior, y cubre el lado superior de la pieza de prueba inmunocromatográfica, la hoja laminada superior se adhiere y cubre la región del reactivo neutralizante, la región de marcado, el soporte, la región de detección y la banda de absorción excluyendo la región de reactivo de ácido sólido o la región de ácido nitroso y excluyendo además la almohadilla de muestra cuando la región de reactivo de ácido sólido o la región de ácido nitroso también sirven como almohadilla de muestra. La región de reactivo de ácido sólido o la región de nitrito pueden adherirse a la parte superior de la hoja laminada superior adhiriéndose a la parte superior de la porción de reactivo de neutralización.

Ejemplos

La presente invención se describirá específicamente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

En los siguientes ejemplos, el % representa el % en p/v a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1

1. inmovilización de anticuerpo *anti-Streptococcus pyogenes* (estreptococo β -hemolítico del grupo A) sobre membrana de nitrocelulosa (soporte)

Se preparó una solución obtenida diluyendo un anticuerpo *anti-Streptococcus pyogenes* con agua purificada a una concentración de 1.0 mg/mL y un anticuerpo IgG anti-conejo. El anticuerpo *anti-Streptococcus pyogenes* se aplicó linealmente al lado de la almohadilla de muestra de una membrana de nitrocelulosa respaldada con una película de PET (tereftalato de polietileno), y el anticuerpo anti-IgG de conejo se aplicó linealmente al lado de la banda de absorción del mismo. A partir de entonces, la membrana de nitrocelulosa se secó a 45 ° C durante 30 minutos para obtener una membrana inmovilizada con anticuerpo *anti-Streptococcus pyogenes*. Esta membrana se denomina "membrana inmovilizada con anticuerpo" en el presente ejemplo.

2. Inmovilización de anticuerpo *anti-Streptococcus pyogenes* sobre partículas de poliestireno coloreadas

Un anticuerpo *anti-Streptococcus pyogenes* se diluyó con agua purificada a una concentración de 1.0 mg/mL, y luego se añadieron partículas de poliestireno coloreadas a la solución obtenida a una concentración de 0.1 %, seguido de agitación. A continuación, se añadió carbodiimida a la solución mixta hasta una concentración del 1 % y la mezcla obtenida se agitó más. Se eliminó un sobrenadante de la mezcla de reacción mediante una operación de centrifugación y luego se resuspendió en Tris 50 mM (pH 9.0) y BSA al 3 % para obtener una suspensión de partículas de poliestireno coloreadas enlazadas a anticuerpos *anti-Streptococcus pyogenes* al 0.04 %. Estas partículas se denominan "partículas inmovilizadas con anticuerpos" en el presente ejemplo.

3. Aplicación y secado de partículas de poliestireno coloreadas enlazadas a anticuerpos *anti-Streptococcus pyogenes*

La suspensión de partículas inmovilizadas con anticuerpo producida en los 2 ejemplos anteriores se aplicó en una cantidad predeterminada a una tela no tejida y luego se secó a 45 ° C durante 30 minutos. La tela no tejida obtenida se denomina "almohadilla seca" en el presente ejemplo.

4. Aplicación de almohadilla de reactivo neutralizante (reactivo básico)

Se aplicaron 3 M Trizma (nombre de marca) Base (base Tris) como reactivo neutralizante (reactivo básico) y Triton X-100 al 1.5 % en una concentración de 30 μ L/cm a un filtro (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.; No 26-3).

5. Producción de almohadilla de reactivo de ácido sólido

Se aplicaron ácido tartárico 1.0 M como reactivo ácido sólido y Triton X-100 al 0.5 % en una concentración de 13 µl/cm a una tela no tejida (Unitika, Ltd.; Elves). Inmediatamente después de la aplicación, la tela no tejida se secó a 45 ° C durante 1 hora para obtener una tela no tejida impregnada con reactivo ácido sólido.

5

6. Producción de piezas de prueba inmunocromatográficas para la detección de *Streptococcus pyogenes*

La membrana inmovilizada con anticuerpos producida en el ejemplo 1 anterior, la almohadilla seca producida en el ejemplo 3 anterior y la almohadilla de reactivo neutralizante (reactivo básico) producida en el ejemplo 4 anterior se adhirieron a otros miembros (una hoja de respaldo y una banda de absorción), seguido de cortar el resultante en una pieza con un ancho de 5 mm, produciendo así una pieza de prueba para detectar *Streptococcus pyogenes*. En el presente ejemplo, una pieza de prueba, en la que los filtros impregnados con reactivo ácido sólido y reactivo neutralizante (reactivo básico) se utilizan como almohadilla de muestra, se denomina "la presente pieza de prueba inmunocromatográfica". Cabe señalar que la pieza de prueba inmunocromatográfica comprende, desde un sitio corriente arriba de la misma, una tela no tejida impregnada con reactivo ácido sólido, una tela no tejida impregnada con reactivo neutralizante (reactivo básico), una almohadilla seca (región de marcado), una membrana inmovilizada con anticuerpos (región de detección) y una banda de absorción a lo largo del flujo de una muestra.

10

15

7. Medición

20

Como muestra negativa, se añadieron gota a gota 75 µl de una solución de nitrito de sodio 2 M suplementada con un indicador de pH (rojo fenol) a la presente pieza de prueba inmunocromatográfica y, de 5 a 60 minutos después, se hizo el juicio.

25

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 1, se reveló que se prefiere un miembro que tenga las siguientes propiedades como miembro al que se aplica un reactivo neutralizante (reactivo básico).

30

(1) Características físicas (peso base y espesor)

10 a 400 g/m² y un espesor de 0.1 a 2.0 mm, preferentemente un peso base de 50 a 300 g/m y un espesor de 0.4 a 0.8 mm, más preferentemente un peso base de aproximadamente 250 g y un espesor de aproximadamente 0.6 mm.

(2) Propiedad de absorción de agua

35

Tener una propiedad de absorción de agua con una cantidad de agua absorbida (por cm²) de 10 µl/cm² hasta 100 µl/cm² y una velocidad de absorción de agua de 1.0 µl/seg a 5 µl/seg, preferiblemente una cantidad de agua absorbida de 30 µl/cm² o más y una velocidad de absorción de agua de 2 µl/seg o menos, más preferiblemente una cantidad de agua absorbida de 30 µl/cm² o más y una velocidad de absorción de agua de 1.5 µl/seg o menos.

(3) Propiedad de retención de agua

40

Tener una propiedad de absorción de agua con una propiedad de retención de agua (por cm²) de 3 µl/cm² hasta 100 µl/cm², preferiblemente 15 µl/cm² o más, después de 5 minutos de contacto con una membrana en estado húmedo.

Las características físicas y la propiedad de absorción de agua deben estar dentro de los intervalos descritos anteriormente, y la propiedad de retención de agua o capacidad de retención no es una propiedad esencial. Sin embargo, es preferible tener tanto la propiedad de retención de agua como la capacidad de retención.

45

[Tabla 1]

Nombre del producto	Fabricante	Numero de articulo	Material	Características físicas				Características							Resumen				
				Peso base (g/m ²)	Espesor (mm)	Resistencia a la tracción seca (Nescol/50 mm)		Tiempo para alcanzar el extremo distal (seg) ²⁻¹	Cantidad de agua absorbida (µl) ²⁻²	Velocidad de absorción de agua (movilidad)(µl/seg) ²⁻³	Cantidad de agua absorbida (µl/cm ²)	Propiedad de absorción de agua	Propiedad de retención de agua	Capacidad de retención	Tiempo de duración de neutralidad en la región de detección	Velocidad de absorción de agua (movilidad)	Cantidad de agua absorbida	Propiedad de retención de agua	Capacidad de retención
						M.D	C.D.												
Bemlise	Asahi Kasei	SE103	Cupra	100	0.54	66	29.3	40	188	4.7	62.7	10	25	15min	Rápido	○	△	△	
		TA30B	(cupro)	38	0.35	26.1	21	60	75	1.3	25.0	5	30	10min	Lento	x	x	x	
		SR60	*1	60	0.47	34.4	28.2	60	125	2.1	41.7	2	27	15min	Normal	△	x	△	
Eltas Nyron	Corp.	N01130	Nailon	/	0.61	550	210	120	150	1.3	50.0	3	30	17min	Lento	○	x	x	
Elves	Unitika, Ltd.	S1003/WDO	PET	100	0.50	400	170	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	30	5min	?	?	x	x	
Filtro de longitud húmeda	Toyo Roshi Kaish	No.26-3	Papel	260	0.58	/	/	185	197	1.1	65.7	18	15	40min	Lento	○	○	○	
Filtro para solución viscosa	Ltd.	No.462	Papel	168	0.53	/	/	125	165	1.3	55.0	3	20	20min	Lento	○	x	○	

Lista de señales de referencia

- 5
 - 1 Soporte (que comprende una región de detección)
 - 2 Región de marcado
 - 3 Región de detección
 - 4 Almohadilla de muestra
- 10
 - 5 Región de reactivo de ácido sólido
 - 6 Región de reactivo neutralizante
 - 7 Banda de absorción
 - 8 Hoja de respaldo
- 15 Usando el dispositivo inmunocromatográfico de la presente invención, el estreptococo β-hemolítico del grupo A puede detectarse con alta sensibilidad.

REIVINDICACIONES

1. Una pieza de prueba inmunocromatográfica para extraer y medir un antígeno de cadena de azúcar en una muestra, la pieza de prueba inmunocromatográfica que comprende: una almohadilla de muestra a la que se agrega una muestra mezclada con nitrito o una solución ácida; una región de marcado que comprende un anticuerpo marcado obtenido marcando un anticuerpo contra el antígeno de la cadena de azúcar; y una región de detección sobre la que se inmoviliza el anticuerpo contra el antígeno de la cadena de azúcar, en donde se forma un complejo anticuerpo marcado con antígeno de la cadena de azúcar-anticuerpo en la región de detección para medir el antígeno de la cadena de azúcar, y la pieza de prueba inmunocromatográfica que tiene una región impregnada con un reactivo neutralizante corriente arriba de la región de marcado, y que además tenga una región impregnada con un reactivo ácido sólido cuando se utilice la muestra mezclada con el nitrito, o una región impregnada con nitrito cuando se utilice la muestra mezclada con la solución ácida, corriente arriba de la región impregnada con el reactivo neutralizante, en donde un material para la región impregnada con el reactivo neutralizante es una tela tejida que tiene un peso base de 10 a 400 g/m² y un espesor de 0.1 a 2.0 mm y que tiene tres propiedades de ser altamente absorbible, tener alta retención de agua y tener poca capacidad de liberación o capacidad de liberación continua, en donde la tela tejida absorbe agua en una cantidad de 10 a 100 µl/cm² por cm/m², tiene una velocidad de absorción de agua de 1.0 a 5.0 µl/seg, retiene agua en una cantidad de 10 a 100 µl/cm² tras un fragmento de 1 cm/m² se permite que entre en contacto con la región de detección en estado húmedo y se deja reposar durante 5 minutos, y tiene un área de dispersión de líquido de 20 mm² o menor después de que un fragmento de 1 cm/m² se deja entrar en contacto en estado húmedo con una membrana y se deja reposar durante 5 minutos, y debido a la alta propiedad de absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar está suficientemente neutralizada, y debido a la baja propiedad de liberación o la propiedad de liberación sostenida de la región impregnada con el reactivo neutralizante, se evita que una solución ácida restante llegue a la región de detección, o se revela continuamente una solución de prueba suficientemente neutralizada hasta la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica.
2. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde debido a la propiedad de alta absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de cadena de azúcar está suficientemente neutralizada, y debido a la propiedad de liberación sostenida de la región impregnada con el reactivo neutralizante, se mantiene una capacidad de neutralización suficiente incluso cuando llega una solución ácida restante a la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica.
3. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde debido a la alta propiedad de absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar está suficientemente neutralizada, y debido a la propiedad de baja liberación de la región impregnada con el reactivo neutralizante, se evita que una solución ácida restante llegue a la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica en un caso negativo, y el desarrollo de color de una línea se previene en o después del momento del juicio en un caso positivo.
4. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región impregnada con el reactivo ácido sólido o el nitrito está presente sobre la almohadilla de muestra o sobre la almohadilla con la región de marcado aplicada a la misma.
5. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el reactivo ácido sólido se selecciona del grupo que consiste en ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido cítrico y ácido tartárico.
6. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el reactivo neutralizante es tris(hidroximetil)aminometano o hidróxido de sodio.
7. La pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el antígeno de cadena de azúcar es el antígeno de cadena de azúcar de protozoos, hongos, bacterias, micoplasma, rickettsia, clamidia o virus.
8. Un método para medir un antígeno de cadena de azúcar en una muestra de acuerdo con un método de inmunocromatografía utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método mezclar la muestra con una solución de ácido nitroso cuando la pieza de prueba inmunocromatográfica tiene una región impregnada con un reactivo ácido sólido, o mezclar la muestra con una solución ácida cuando la pieza de

prueba inmunocromatográfica tiene una región impregnada con nitrito, y agregar la mezcla a una almohadilla de muestra de la pieza de prueba inmunocromatográfica, en donde en el método inmunocromatográfico, el antígeno de la cadena de azúcar se extrae de la muestra por la acción del ácido nitroso generado a través de una reacción del nitrito con el reactivo ácido sólido en la región impregnada con el reactivo ácido sólido o la región impregnada con el nitrito, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar se neutraliza en una región impregnada con un reactivo neutralizante, y se forma un complejo de anticuerpo marcado con antígeno de cadena de azúcar-anticuerpo en una región de detección, y en donde debido a la alta propiedad de absorción de agua y la propiedad de alta retención de agua de la región impregnada con el reactivo neutralizante, la solución ácida que contiene el antígeno de la cadena de azúcar está suficientemente neutralizada, y debido a la baja propiedad de liberación o la propiedad de liberación sostenida de la región impregnada con el reactivo neutralizante, se evita que una solución ácida restante llegue a la región de detección, o se agrega continuamente una solución de prueba suficientemente neutralizada a la región de detección, de modo que se suprime una reacción no específica.

Fig. 1

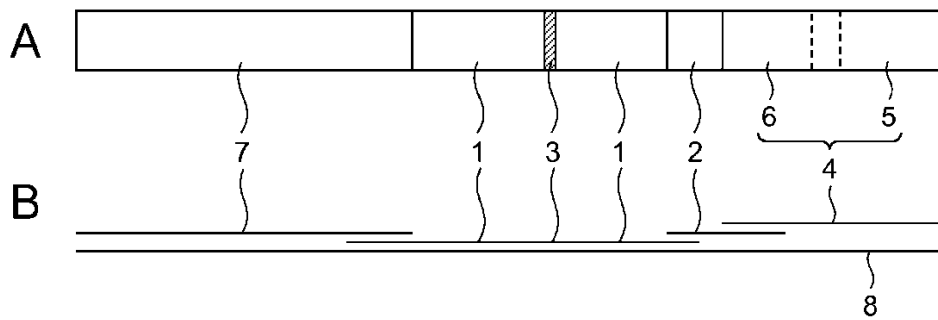


Fig. 2

