



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 911 T2 2007.12.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 941 468 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 911.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/21245**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 949 502.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/022800**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **28.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.09.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **11.07.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/00 (2006.01)**

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/538 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

752695 19.11.1996 US

963412 03.11.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Genzyme Corp., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:

**REHG, Leslie, San Diego, CA 92128, US; HUANG,
Ching, Chula Vista, CA 91911, US; WILLRODT,
Michael J., Escondido, CA 92025, US;
Cunningham, Herbert Bradfield, c/o Wyntek
Diagn.Inc, San Diego, California 92121, US; FAN,
Eugene, La Jolla, CA 92037, US**

(74) Vertreter:

**Grund, M., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 80802
München**

(54) Bezeichnung: **EIN-SCHRITT HYBRIDIMMUNOCHROMATOGRAPHISCHES GERÄT UND VERFAHREN ZUR VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Allgemeiner Stand der Technik

[0001] Diese Erfindung betrifft immunologische Verfahren und Vorrichtungen zum Nachweis von Analyten in biologischen Proben.

[0002] Zahlreiche Ansätze sind zum Nachweis eines gegebenen Analyten in einer biologischen Probe entwickelt worden. Typisch für diese Verfahren sind die so genannten „Lateralfly“- und „Durchfly“-Vorrichtungen und -Verfahren. Die Durchflyvorrichtung verwendet im Allgemeinen ein poröses Material mit einer Reagens enthaltenden Matrix, die darauf geschichtet oder darin eingebunden ist. Eine Testprobe wird auf das poröse Material aufgebracht und fließt durch dieses hindurch und ein Analyt in der Probe reagiert mit dem Reagens bzw. den Reagenzien, um ein nachweisbares Signal auf dem porösen Material zu produzieren. Diese Vorrichtungen sind im Allgemeinen in ein Kunststoffgehäuse oder einen Kunststoffkasten eingeschlossen, wobei Kalibrierungen bei dem Nachweis des bestimmten Analyten helfen.

[0003] Lateralfly-Assays nutzen ebenfalls eine poröse Membran zum Durchführen eines Analytnachweises. Anstatt die Probe senkrecht durch die Membran zu ziehen, wird der Probe ermöglicht, lateral von einer Aufbringungszone zu einer Reaktionszone auf der Membranoberfläche zu fließen. Das Erfassungsreagens liegt in der Reaktionszone vor und der erfasste Analyt kann mittels einer Vielfalt von Protokollen nachgewiesen werden, einschließlich direkter Sichtbarmachung von sichtbaren Teilen, die mit dem erfassten Analyten assoziiert werden.

[0004] In einem Schritt laufende Lateralfly-Assays ermöglichen einem Benutzer, eine Probe in einen Probenaufbringungsbereich zu geben und ein positives oder negatives Signal zu erhalten, das das Vorliegen oder das Fehlen des Testanalyten in der Probe signalisiert.

[0005] In einem Schritt arbeitende Lateralflyvorrichtungen beinhalten einen Probenaufbringungsbereich, auf den die Probe aufgebracht wird. Der Probenaufbringungsbereich steht in Lateralflykontakt mit dem porösen Trägermaterial des Analytnachweisbereichs.

[0006] Während des Lateralflyes wird die Probe in Kontakt mit einem mobilen Indikatorreagens in einer diskreten Zone des Analytnachweisbereichs gebracht. Das Indikatorreagens enthält sowohl einen Bindungsteil, der spezifisch an den Zielanalyten bindet, und einen Indikatorteil, bei dem es sich meistens um einen farbgebenden Marker handelt. Zielanalytmoleküle, die sich im Lateralfly bewegen, binden an das Indikatorreagens und werden schließlich in der Erfassungszone immobilisiert, für gewöhnlich durch Binden an ein zweites Reagens, das spezifisch an den Analyten oder an den Komplex aus Analyt und Indikatorreagens bindet. Die Position des immobilisierten Indikatorreagens hat ein positives Signal zur Folge. Weitere Signale können einen negativen Reaktionsindikator, einen Testabschlussindikator und einen positiven Kontrollindikator beinhalten.

[0007] In einem Schritt arbeitende immunchromatographische Vorrichtungen, die das Indikatorreagens in einer diskreten Zone des porösen Lateralfly-Materials, z. B. an einer diskreten Stelle auf dem Teststreifen, enthalten, sind beschrieben worden.

[0008] Zum Beispiel beschreiben Deutsch et al. in den US-Patentschriften Nr. 4,094,647, 4,235,601 und 4,361,537 eine quantitative chromatographische Teststreifenvorrichtung. Die Vorrichtung umfasst einen Materialstreifen, der eine Lösung mittels Kapillarwirkung, d. h. Flüssigkeitstransportwirkung, transportieren kann. Verschiedene Gebiete oder Zonen in dem Streifen enthalten die Reagenzien, die zum Produzieren eines nachweisbaren Signals erforderlich sind, während der Analyt zu oder durch solche Zonen transportiert wird. Ein diffusionsfähiger Marker, der an den Testanalyten binden kann, kann sich in einem diskreten Bereich des Streifens befinden. Die Vorrichtung ist sowohl für chemische Assays als auch für Bindungsassays, die durch die Bindungsreaktion zwischen einem Antigen und dessen komplementären Antikörper typisiert sind, geeignet.

[0009] Darüber hinaus beschreibt die britische Anmeldung Nr. 2,204,398 eine Lateralflyvorrichtung, bei der auf die Vorrichtung aufgebrachte Probe markiertes Reagens aufnimmt, das sich an einer diskreten Stelle auf dem porösen Trägerstoff des Streifens befindet, und in eine Nachweiszone eindringt. Die Indikatormarker beinhalten Goldsole und farbige Teilchen.

[0010] Alternativ dazu wurden Vorrichtungen, die das mobile Indikatorreagens in einem separaten porösen Material oder Kissen enthalten, offenbart.

[0011] Zum Beispiel offenbart die europäische Veröffentlichung Nr. 323,605 eine Prüfvorrichtung, die chromatographisches Material verwendet und bei der sich die Testprobe durch Kapillarwirkung von einem Ende zu dem anderen bewegen kann. Das chromatographische Material enthält ein immobilisiertes Erfassungsreagens, das an den Analyten binden kann. Das Aufbringungskissen, das die Testprobe aufnimmt, enthält ebenfalls ein diffusionsfähiges Indikatorreagens, das von dem Aufbringungskissen zu dem chromatographischen Material migrieren kann. Das Indikatorreagens kann an den Analyten binden. Die Bindung des Komplexes aus Indikatorreagens und Analyt resultiert in einem nachweisbaren Signal am Erfassungsort.

[0012] Die PCT-Anmeldung Nr. WO 94/06013 beschreibt ebenfalls einen Lateralfluss-Assay, bei dem das Indikatorreagens in einem separaten Indikatorreagensbereich oder -kissen (als „das dritte flüssige durchlässige Material“ bezeichnet) angeordnet wurde. Die Probe wird auf ein separates Probenaufbringungskissen aufgebracht, wobei sich das Indikatorreagens in dem dritten flüssigen durchlässigen Material befindet. Die Probe tritt dann in das Flüssigkeitstransportmaterial ein, das die Erfassungszone beinhaltet.

[0013] Die Patentanmeldung WO 92/01226 beschreibt eine Lateralflussvorrichtung, bei der das markierte spezifische Bindungsreagens im trockenen Zustand entweder in einer Zone auf dem Trägermaterial oder in einem separaten porösen Körper, durch den die Probe auf dem Weg zu dem porösen Trägermaterial des Teststreifens läuft, bewahrt wird.

[0014] Die US-Patentanmeldung 08/444,238 und dessen entsprechende PCT-Anmeldung 96/04748 beschreiben ebenfalls Lateralflussprüfvorrichtungen, bei denen sich das markierte Reagens für den Analyten in einer diskreten Zone des porösen Trägermaterials des Analytnachweisbereichs befindet.

[0015] Andere Variationen von Teststreifen-Assays sind in den US-Patentschriften Nr. 4,298,688, 4,517,288 und 4,740,468 offenbart, die plattenartige Diagnosevorrichtungen beschreiben, die einen oder mehrere Streifen, die hintereinander angeordnet sind, mit Zonen, die hintereinander liegen, umfassen. Jede Zone ist von oben und unten zur Zugabe von Reagenzien leicht zugänglich. Solche Vorrichtungen können die Menge eines Analyten quantitativ bestimmen.

[0016] Verfahren, die chromogene und Fluoreszenzfarbstoffe als Marker in biologischen Prüfverfahren, sind ebenfalls bekannt. Typische Prüfprotokolle bedingen eine direkte oder indirekte Bindung eines Farbstoffmarkers an einem Analyten oder Analytanalogon in einer biologischen Probe, wobei das Vorliegen oder Fehlen des Farbstoffs in einer bestimmten Stufe des Assays visuell ermittelt und mit der Menge des anfangs in der Probe vorhandenen Analyten in Zusammenhang gebracht werden kann. Es existiert eine große Auswahl an spezifischen Prüfprotokollen.

[0017] Eine Reihe dieser Assays nutzt natürlich farbige oder gefärbte Teilchen als einen Marker, wobei die Teilchen an einen Antikörper oder eine andere spezifische Bindungssubstanz gebunden werden. Zu vorgeschlagenen Teilchen zählen gefärbte Latexkügelchen, mit Farbstoff durchtränkte Liposome, Erythrozyten, Metallsole und dergleichen. Das farbige Teilchen in solchen Komplexen kann als ein sichtbarer Marker dienen, wobei Separation, Erfassung und Aggregation der Teilchen durch die Bindung des Antikörpers oder der anderen spezifischen Bindungssubstanz vermittelt wird. Die Menge des Markers, der so in einem bestimmten Prüfschritt abgesondert wurde, steht in Zusammenhang mit der Menge des anfangs in der Probe vorhandenen Analyten.

[0018] Zum Beispiel beschreibt die US-Patentschrift Nr. 4,943,522 einen Festphasen-Lateralfluss-Assay unter Verwendung von Erythrozyten als einem Marker. Die US-Patentschrift Nr. 4,863,875 beschreibt Zusammensetzungen, die mindestens zehn Farbstoffmoleküle oder -monomere umfassen, die durch eine Isocyanatgruppe an dem Farbstoff kovalent an einen Antikörper angelagert werden. Die US-Patentschrift Nr. 4,703,017 beschreibt eine Festphasen-Prüfvorrichtung, die sich auf die spezifische Bindung eines Konjugats aus Ligand und Marker an einem festen Träger stützt, wobei der Marker als ein Teilchen, wie ein Liposom oder eine Polymermikrokapsel, offenbart ist. Die US-Patentschrift Nr. 4,608,246 beschreibt Assays zum Typisieren von Blut, die Erythrozyten als ein Markierungsagens einsetzen. Die US-Patentschrift Nr. 4,452,886 beschreibt die kovalente Anlagerung von photonenabsorbierenden oder -abgebenden Polymeren an Proteine, wie Antikörper und Antigene. Die US-Patentschrift Nr. 4,373,932 beschreibt die Markierung eines Liganden mit einer wässrigen Dispersion eines hydrophoben Farbstoffs oder Pigments oder einem Polymerkern, der mit solch einem Farbstoff oder Pigment beschichtet ist. Die US-Patentschrift Nr. 4,313,734 beschreibt Verfahren zum Nachweisen von Probenanalyten mittels Bestimmung des Gehalts an metallischem Marker in der Probe. Die US-Patentschrift Nr. 4,169,138 beschreibt Immunassays, die sichtbare Teilchen einsetzen, die ungefärbte Mikroorganismen enthalten und an Polymere gebunden sind, die mikrobiellen Ursprungs sein können.

[0019] Andere Lateralflyssprotokolle beinhalten die US-Patentschrift 4,943,522, die auf eine Lateralflyssvorrichtung gerichtet ist, die sich darauf stützt, dass ein nicht saugfähiger Träger Flüssigkeiten von einem Abschnitt der Vorrichtung zu einem anderen leitet. Die PCT-Veröffentlichung WO 92/12428, die mit der obigen Patentschrift verwandt ist, stellt eine Verbesserung dieses Verfahrens und dieser Vorrichtung dar, wobei nicht saugfähiger Lateralflyss verwendet wird, um sichtbare Teile, insbesondere markierte Teilchen, \z. B. gefärbter Latex, rote Blutzellen oder Liposome, zu leiten, die mit einem Analyten oder einem Konkurrenten dieses in einer Erfassungszone zum Nachweis reagieren kann, wobei ein saugfähiger Träger verwendet wird, dessen Saugfähigkeit mittels Behandlung mit einem Blockierungsagens umgekehrt wurde. Das Ergebnis ist ein in einem Schritt laufender Assay, der in einem sehr kurzen Zeitraum (in der Regel innerhalb von 60 Sekunden) durchgeführt werden kann und bei dem die Ableitung für gewöhnlich augenblicklich, nachdem die Probe eine Erfassungszone berührt hat, zur Verfügung steht.

[0020] Diese in einem Schritt laufenden Assays sind komplexe Vorrichtungen, die eine Reihe von Immunsayreagenzien enthalten. Da die Möglichkeit, die Probe zu handhaben, begrenzt ist, ist es wünschenswert, andere Designvariationen zu entwickeln, die den Empfindlichkeitsbereich des Assays erhöhen, ohne weder die zum Durchführen des Assays erforderliche Zeit zu verlängern noch die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse zu erhöhen.

[0021] Keine der hierin beschriebenen Referenzen ist als Stand der Technik anerkannt.

[0022] WO 96/33413 offenbart eine in einem Schritt arbeitende immunchromatographische Vorrichtung, die einen Probenaufnahmebereich, einen Analytnachweisbereich und einen Endbereich aufweist, die aus porösem Material hergestellt sind und zum Lateralflyss fähig sind. Der Analytnachweisbereich enthält Markierungsreagenzien, ein Erfassungsreagens und ein Kontrollreagens.

Zusammenfassung der Erfindung

[0023] Diese Erfindung betrifft eine Immunsayvorrichtung mit einem erhöhten Assayempfindlichkeitsbereich. Änderungen der Konzentration von Markierungsreagenzien, der Pufferzusammensetzung der Markierungsreagenzien und der Anordnung der Markierungsreagenzien können die Empfindlichkeit des Assays, das Auftreten von falsch-positiven Reaktionen und die Zeit, die zum Erreichen der Clearance von ungebundenen Indikatormarkierungsreagenzien durch die Vorrichtung erforderlich ist, modifizieren.

[0024] Die Immunsayvorrichtungen dieser Erfindung erhöhen den Assayempfindlichkeitsbereich, ohne die zum Durchführen des Assays erforderliche Zeit zu verlängern oder das Auftreten von falsch-positiven Reaktionen zu vermehren. Der erhöhte Assayempfindlichkeitsbereich wird erzielt, indem mindestens zwei Indikatormarkierungsreagenzien bereitgestellt werden, die unterschiedliche Lateralflysscharakteristika aufweisen: Die Lateralflysscharakteristika eines gegebenen Indikatormarkierungsreagens können modifiziert werden, beispielsweise indem das Indikatormarkierungsreagens in zwei Bereichen der Lateralflyssvorrichtung angeordnet wird, die unterschiedliche Lateralflyssraten aufweisen, oder indem die Zusammensetzung der Indikatormarkierungsreagenslösung verändert wird, die auf die Lateralflyssvorrichtung aufgebracht wird. Darüber hinaus können sowohl die Position als auch die Zusammensetzung der zwei Lösungen, die das Indikatormarkierungsreagens enthalten, verändert werden.

[0025] Vorzugsweise enthält die Vorrichtung zwei Indikatormarkierungsreagenzien, deren Lateralflysseigenschaften sich unterscheiden, d. h. ein erstes Indikatormarkierungsreagens und ein zweites Indikatormarkierungsreagens. Obwohl die Markierungsreagenzien als das erste, das zweite, ... das n-te Indikatormarkierungsreagens bezeichnet werden, um die unterschiedlichen Lateralflysseigenschaften des ersten bis zum n-ten Indikatormarkierungsreagens anzuzeigen, kann das eigentliche Analytbindungsmolekül der Indikatormarkierungsreagenzien gleich oder verschieden sein, solange die Lateralflysseigenschaften der Indikatormarkierungsreagenzien sich unterscheiden.

[0026] Zum Beispiel können die Lateralflysseigenschaften eines gegebenen Indikatormarkierungsreagens modifiziert werden, indem ein Indikatormarkierungsreagens für den Analyten in zwei verschiedenen Gebieten der Vorrichtung angeordnet wird – sowohl in einer diskreten Zone des porösen Lateralflyss-Trägermaterials des Analytnachweisbereichs als auch in einem separaten porösen Bereich, durch den die Probe zu der Erfassungszone fließen muss. In diesem Beispiel kann das Indikatormarkierungsreagens in der diskreten Zone des porösen Lateralflyss-Trägerstoffs das erste Indikatormarkierungsreagens genannt werden, während das Indikatormarkierungsreagens, das sich in der separaten porösen Zone befindet, als das zweite Indikatormarkierungsreagens bezeichnet werden kann oder umgekehrt.

[0027] Alternativ oder zusätzlich dazu können zwei Lösungen, die ein Indikatormarkierungsreagens enthalten, auf verschiedene Zonen der Vorrichtung aufgebracht werden. Die Zusammensetzung der Indikatormarkierungslösung kann modifiziert werden, indem beispielsweise die Konzentration gelöster Stoffe in der Lösung modifiziert wird. Unterschiedliche Lösungen des Indikatormarkierungsreagens, die unterschiedliche Konzentrationen gelöster Stoffe enthalten, können auf verschiedene Zonen der Vorrichtung aufgebracht und dann getrocknet werden, was in Veränderungen der Viskosität der Probe, während sie durch diese verschiedenen Zonen der Vorrichtung läuft, oder Veränderungen der Rehydrationsrate des Indikatormarkierungsreagens resultiert. Die Unterschiede bei der Viskosität der Probenlösung, während sie lateral durch diese Zonen fließt, oder bei der Rehydrationsrate des Indikatormarkierungsreagens werden unterschiedliche Lateralfusseigenschaften verleihen, während die Probe durch diese zwei Zonen fließt. Diese Zonen können sich auf demselben porösen Bereich der Vorrichtung oder auf separaten porösen Bereichen befinden.

[0028] Zuvor beschriebene in einem Schritt arbeitende Vorrichtungen enthielten das Indikatormarkierungsreagens für den Analyten in nur einer von zwei Positionen – entweder in dem porösen Lateralfuss-Trägermaterial des Teststreifens oder in einem separaten porösen Material, beispielsweise einem Kissen aus porösem Material. Darüber hinaus beinhalteten zuvor beschriebene Vorrichtungen nicht zwei oder mehr unterschiedliche Zonen von Indikatormarkierungsreagenzien, die unterschiedliche Zusammensetzungen getrockneter gelöster Stoffe enthalten.

[0029] In einem Schritt arbeitende Vorrichtungen, die das Indikatormarkierungsreagens sich in einem diskreten Bereich in dem porösen Lateralfuss-Material, z. B. in einer Markerzone auf dem Teststreifen, befindend enthalten, haben den Vorteil; dass das Indikatormarkierungsreagens schnell rehydriert oder mobilisiert wird, was zu einer schnelleren Clearance-Zeit führt. Das heißt, die Zeit, die ungebundenes Indikatormarkierungsreagens benötigt, durch die Erfassungszone zu laufen, ist kürzer. Da der Komplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens jedoch weniger Zeit hatte, um mit dem Indikatorerfassungsreagens in der Erfassungszone zu inkubieren und an diesen zu binden und da die Zeit für das Indikatormarkierungsreagens, an den Analyten zu binden, kürzer ist, weisen diese Arten von Vorrichtungen einen geringeren Empfindlichkeitsbereich auf als Vorrichtungen, die das Indikatorreagens in einem separaten Markierungsreagens-Bereich oder einem Markierungskissen enthalten. Darüber hinaus erhöht das Erhöhen des Spiegels des Indikatormarkierungsreagens, das in dem porösen Trägerstoff enthalten ist, die maximale Konzentration des Indikatormarkierungsreagens, die durch die Erfassungszone läuft, was die mögliche Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen erhöht.

[0030] Andererseits ermöglicht die Anordnung des Indikatormarkierungsreagens in einem separaten Bereich, z. B. einem porösen Kissen, eine stärker retardierte Freisetzung des Indikatormarkierungsreagens über einen langen Zeitraum. Dies resultiert in einem längeren Zeitraum zur Inkubation des Indikatormarkierungsreagens mit dem Analyten und einem längeren Zeitraum zur Bewegung von sowohl gebundenem als auch ungebundenem Indikatormarkierungsreagens, um die Erfassungszone zu passieren. Dies wiederum hat eine höhere Empfindlichkeit zur Folge, resultiert jedoch auch in langsameren Clearance-Zeiten. Ein Erhöhen der Menge des Indikatormarkierungsreagens in dem separaten Kissen kann die Empfindlichkeit am unteren Ende weiter erhöhen, d. h. die Fähigkeit, niedrige Analytkonzentrationen nachzuweisen, steigern, resultiert jedoch in noch längeren Clearance-Zeiten. Folglich, anstelle die Menge des Indikatormarkierungsreagens in entweder einem separaten porösen Indikatormarkierungsreagens-Bereich oder in einer diskreten Zone des Materials des porösen Lateralfuss-Trägermaterials des Analytnachweisbereichs zu erhöhen, beinhalten die Vorrichtungen dieser Erfindung mindestens zwei Zonen von Indikatormarkierungsreagens mit unterschiedlichen Lateralfusseigenschaften.

[0031] Folglich beschreibt diese Erfindung in einem Gesichtspunkt eine immunchromatographische Prüfvorrichtung zum Nachweis des Vorliegens oder Fehlens eines Analyten in einer flüssigen Probe, wobei die immunchromatographische Prüfvorrichtung Folgendes umfasst:

- (a) einen Probenaufnahmebereich, der ein poröses Material umfasst, das den Lateralfuss einer flüssigen Probe leitet, in Lateralflusskontakt mit
- (b) einem Analytnachweisbereich, der ein poröses Material umfasst, das den Lateralfuss der flüssigen Probe leitet, wobei der Analytnachweisbereich ein immobiles Indikatorerfassungsreagens an einem diskreten Indikatorerfassungsreagens-Ort umfasst,

wobei die immunchromatographische Vorrichtung außerdem Folgendes umfasst: eine erste Indikatormarkierungsreagens-Zone, die ein erstes mobiles Indikatormarkierungsreagens umfasst, und eine zweite Indikatormarkierungsreagens-Zone, die ein zweites mobiles Indikatormarkierungsreagens umfasst, wobei die Lateralfusscharakteristika des Indikatormarkierungsreagens in der ersten Zone sich von den Lateralfusscharakteristika des Indikatormarkierungsreagens in der zweiten Zone unterscheiden und wobei die Zonen in Lateralfuss-

kontakt mit dem Probenaufnahmebereich und dem Analytnachweisbereich stehen und wobei die flüssige Probe von dem Probenaufnahmebereich lateral in Richtung des Analytnachweisbereichs fließt und sich mit dem ersten und dem zweiten Indikatormarkierungsreagens vermischt, um das erste und das zweite Indikatormarkierungsreagens in Richtung des Analytnachweisbereichs zu bewegen.

[0032] Die Erfindung beinhaltet die weiteren Merkmale, wie sie in den Ansprüchen 2, 3 und 4 dargelegt sind.

[0033] In einer ersten bevorzugten Ausführungsform enthalten die Vorrichtungen dieser Erfindung Indikatormarkierungsreagens in sowohl einem separaten porösen Material als auch sich in einem diskreten Bereich des porösen Lateralfluss-Trägerstoffs des Analytnachweisbereichs befindet. Dies resultiert in einem erhöhten Empfindlichkeitsbereich, ohne eine Erhöhung der Anzahl von falsch Positiven zur Folge zu haben oder die Clearance-Zeit zu verlängern.

[0034] Folglich können die Immunassayvorrichtungen dieser Erfindung in einer ersten bevorzugten Ausführungsform ein erstes Gebiet der Anordnung des Indikatormarkierungsreagens in einem separaten porösen Material, z. B. einem Kissen, beinhalten, das an den Probenaufnahmebereich angrenzt und in direktem Kontakt mit dem porösen Lateralfluss-Material des Analytnachweisbereichs steht ([Fig. 1](#)). Das zweite Gebiet der Anordnung des Indikatormarkierungsreagens ist in einer diskreten Zone in dem porösen Material des Analytnachweisbereichs ([Fig. 1](#)). Das Indikatormarkierungsreagens in der diskreten Zone wird schnell mobilisiert, wenn es von der lateral fließenden Probenflüssigkeit berührt wird, wodurch eine hohe Anfangskonzentration des Indikatormarkierungsreagens, die durch die Erfassungszone läuft, erzeugt wird. Darüber hinaus ermöglicht die Anordnung des Indikatormarkierungsreagens in dem separaten porösen Material, d. h. einem separaten Markierungsreagens-Bereich, eine retardierte Freisetzung des Indikatormarkierungsreagens, während die Probenflüssigkeit sich mittels Kapillarwirkung durch den separaten Markierungsreagens-Bereich in den Bereich des porösen Lateralfluss-Materials bewegt. Die retardierte Freisetzung des Indikatormarkierungsreagens für den Analyten fördert die Assayempfindlichkeit am unteren Ende, indem die Zeit der Inkubation des Indikatormarkierungsreagens mit dem Analyten verlängert wird und die Zeit der Inkubation des gebundenen Indikatormarkierungsreagens mit dem Indikatorerfassungsreagens in der Erfassungszone verlängert wird. Dies resultiert in einer Erhöhung der Menge an gebundenem Marker, die durch die Erfassungszone läuft, ohne die maximale Konzentration des Markers, die durch die Erfassungszone läuft, (und die Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen) zu erhöhen und ohne die Clearance-Zeit im Vergleich zu einer Prüfvorrichtung, in der das Indikatormarkierungsreagens nur in einem separaten Markierungsreagens-Bereich angeordnet wird, zu verlängern.

[0035] In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform beinhaltet die Vorrichtung mindestens zwei Zonen, auf die unterschiedliche Indikatormarkierungsreagenslösungen aufgetragen wurden. Die unterschiedlichen Indikatormarkierungsreagenslösungen unterscheiden sich in Bezug auf die Konzentration gelöster Stoffe. Das Indikatormarkierungsreagens in den zwei Lösungen kann an dasselbe oder verschiedene Epitope des Analyten binden. Wenn eine Lösung des Indikatormarkierungsreagens in einer Lösung mit einer niedrigen Konzentration gelöster Stoffe, d. h. einer niedrigen Konzentration von Zuckern wie Saccharose, auf die Vorrichtung aufgebracht wird, wird das Indikatormarkierungsreagens schnell mobilisiert, was zu einer schnelleren Clearance-Zeit, aber einer kürzeren Zeit zur Wechselwirkung des Indikatormarkierungsreagens mit dem Analyten führt.

[0036] Andererseits, wenn das Indikatormarkierungsreagens in einer Lösung mit einer hohen Konzentration gelöster Stoffe auf die Vorrichtung aufgebracht wird, wird das Indikatormarkierungsreagens langsamer mobilisiert, was zu einer langsameren Clearance-Zeit, aber einer höheren Empfindlichkeit aufgrund einer längeren Zeit für das Indikatormarkierungsreagens, zu inkubieren und an den Analyten zu binden, führt.

[0037] Folglich können die Immunassayvorrichtungen dieser Erfindung in einer zweiten bevorzugten Ausführungsform eine erste Zone beinhalten, die Indikatormarkierungsreagens enthält, das in einer Lösung aufgetragen wurde, die eine niedrige Konzentration gelöster Stoffe enthält. Das zweite Anordnungsgebiet enthält Indikatormarkierungsreagens, das in einer Lösung aufgetragen wurde, die eine hohe Konzentration gelöster Stoffe enthält.

[0038] Das Indikatorreagens in der Zone mit wenig gelösten Stoffen wird schnell rehydriert oder mobilisiert, wenn es von der lateral fließenden Probenflüssigkeit berührt wird, wodurch eine hohe Anfangskonzentration des Indikatormarkierungsreagens, die durch die Erfassungszone läuft, erzeugt wird. Darüber hinaus ermöglicht die Anordnung des Indikatormarkierungsreagens in dem zweiten Gebiet mit hoher Konzentration gelöster Stoffe eine retardierte Freisetzung des Indikatorreagens, während die Probenflüssigkeit sich durch diesen Be-

reich bewegt, während die Viskosität der Probe ansteigt und die Rehydrationsrate fällt. Die retardierte Freisetzung des Indikatorreagens für den Analyten fördert die Assayempfindlichkeit am unteren Ende, indem sowohl die Zeit der Inkubation des Indikatormarkierungsreagens mit dem Analyten als auch die Zeit der Inkubation des gebundenen Indikatormarkierungsreagens mit dem Indikatorerfassungsreagens in der Erfassungszone verlängert wird. Dies resultiert in einer Erhöhung der Menge an gebundenem Marker, die durch die Erfassungszone läuft, ohne die maximale Konzentration des Markers, die durch die Erfassungszone läuft, (und die Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen) zu erhöhen und ohne die Clearance-Zeit im Vergleich zu einer Prüfvorrichtung, in der das Indikatormarkierungsreagens nur in einem separaten Markierungsreagens-Bereich angeordnet wird, zu verlängern.

[0039] Vorzugsweise, wenn das erste Indikatormarkierungsreagens und das zweite Indikatormarkierungsreagens in separaten porösen Bereichen der Vorrichtung angeordnet werden, ist die Konzentration des Indikatormarkierungsreagens in dem separaten Markierungsreagens-Bereich niedriger als die Konzentration in der diskreten Zone des Analytnachweisbereichs. Vorzugsweise, wenn das erste Indikatormarkierungsreagens-Gebiet und das zweite Indikatormarkierungsreagens-Gebiet sich in Bezug auf die Konzentration gelöster Stoffe unterscheiden, wird die Konzentration des Indikatormarkierungsreagens, das zuerst in Lateralflusskontakt mit der Probe kommt, niedriger sein als die Konzentration des Indikatormarkierungsreagens, das anschließend in Lateralflusskontakt mit der Probe kommt.

[0040] Zudem resultiert Lateralflusskontakt der Probe mit dem ersten Indikatormarkierungsreagens in dem separaten Markierungsreagens-Bereich vorzugsweise in einer retardierten Freisetzung des ersten Indikatormarkierungsreagens, während Lateralflusskontakt der Probe mit dem zweiten Indikatormarkierungsreagens in der Markierungsreagens-Zone des Analytnachweisbereichs in einer schnellen Freisetzung des zweiten Indikatormarkierungsreagens resultiert.

[0041] Diese Vorrichtung stellt ein einfaches, zweckmäßiges Prüfverfahren mit erhöhter Empfindlichkeit und keiner Verlängerung der Clearance-Zeit bereit. Diese Vorrichtung ist zum Nachweisen verschiedener Analyten in einer flüssigen Probe von Nutzen.

[0042] Unter Nutzung der Testvorrichtung der vorliegenden Erfindung kann die Vorrichtung mit einem Verfahren zum direkten Nachweis von Analyten aus einer biologischen Probe, wie Urin, Blut, Sputum oder aus einem Tupfer oder Fäzes extrahiertem Material, genutzt werden. Insbesondere kann die Erfindung zum Nachweisen des Vorliegens oder Fehlens von humanem Choriongonadotropin („hCG“) in Urin verwendet werden. Dieser Nachweis ist beim Ermitteln eines positiven oder negativen Befunds einer Schwangerschaft in Frauen nützlich. Alternativ kann die Erfindung zum Nachweisen des Vorliegens oder Fehlens eines Antigens von Streptococcus, beispielsweise Streptococcus pyogenes der Gruppe A, in aus Tupfern von Rachenabstrichen verwendet werden.

[0043] In einem ersten Gesichtspunkt der Erfindung steht der separate Probenaufnahmebereich mit einem separaten Markierungsreagens-Bereich in Kontakt, der ebenfalls aus einem porösen Material hergestellt ist, das den Lateralfluss der Probe leitet. Der separate Markierungsreagens-Bereich steht mit einem separaten Analytnachweisbereich in Kontakt. Der Lateralfluss der Probe wird von dem Probenaufnahmebereich zu dem separaten Markierungsreagens-Bereich zu dem Analytnachweisbereich weiterlaufen. Der Analytnachweisbereich beinhaltet ein poröses Material, das den Lateralfluss der flüssigen Probe leitet. Vorzugsweise beinhaltet der Analytnachweisbereich eine diskrete Zone, die ein zweites Indikatormarkierungsreagens enthält, das spezifisch an den Analyten bindet. Die diskrete Zone und/oder der separate Markierungsreagens-Bereich können außerdem ein mobiles Kontrollmarkierungsreagens enthalten.

[0044] Die Analytnachweiszone beinhaltet außerdem eine Erfassungszone. Die Erfassungszone ist eine diskrete Zone, die ein immobiles Indikatorerfassungsreagens enthält, das an den Analyten oder den Komplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens binden kann. Die Erfassungszone kann außerdem ein zweites Erfassungsreagens, d. h. ein Kontrollmarkererfassungsreagens, enthalten, das an das Kontrollmarkierungsreagens bindet.

[0045] Alternativ in einem zweiten Gesichtspunkt kann die Probenaufnahmebereich in direktem Kontakt mit dem Analytnachweisbereich stehen, der in direktem Kontakt mit einem separaten Markierungsreagensbereich steht ([Fig. 2](#)). In dieser Konfiguration wird der Analytnachweisbereich in zwei Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt wird den Ort oder die Zone für das Indikatormarkierungsreagens für den Analyten und die Zone, die das Kontrollmarkierungsreagens enthält, beinhalten. Der zweite Abschnitt des Analytnachweisbereichs wird diskrete Zonen beinhalten, die das Indikatorerfassungsreagens für den Analyten und das Kontrollmarkererfassungsreagens enthalten.

[0046] In noch einer anderen alternativen Ausführungsform kann der Probenaufnahmebereich entweder ein erstes Indikatormarkierungsreagens für den Analyten enthalten ([Fig. 3](#)) oder über dem separaten Markierungsreagens-Bereich, der ein erstes Indikatormarkierungsreagens enthält, in direktem Flusskontakt mit dem separaten Markierungsreagens-Bereich positioniert sein. Alternativ kann ein anderer separater poröser Bereich unter dem Probenaufnahmebereich und über dem separaten Markierungsreagens-Bereich angeordnet sein, um den direkten Fluss der Probe zu dem separaten Markierungsreagens-Bereich zu unterstützen.

[0047] Der Analytnachweisbereich steht außerdem in Lateralflusskontakt mit dem Endflussbereich. Der Endflussbereich beinhaltet ein poröses Material, das den Lateralfluss der flüssigen Probe leitet. Es kann überschüssige flüssige Probe absorbieren.

[0048] Im obigen Gesichtspunkt können das erste Indikatormarkierungsreagens für den Analyten (das in dem separaten Markierungsreagens-Bereich vorliegt) und das zweite Indikatormarkierungsreagens (das in der diskreten Zone des Analytnachweisbereichs vorliegt) einen Komplex mit dem Analyten bilden. Das Analytbindungsmolekül kann in dem ersten Indikatormarkierungsreagens und dem zweiten Indikatormarkierungsreagens gleich oder verschieden sein.

[0049] Das Kontrollmarkierungsreagens ist mobil, bildet jedoch weder mit dem Analyten noch mit dem Indikatorerfassungsreagens einen Komplex. Das Indikatorerfassungsreagens kann den Komplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens bzw. Indikatormarkierungsreagenzien binden, entweder durch Erkennen einer Bindungsstelle an dem Analyten oder an dem Komplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens bzw. Indikatormarkierungsreagenzien. Das Kontrollerfassungsreagens kann das Kontrollmarkierungsreagens binden.

[0050] Darüber hinaus sind die porösen Materialien in dem obigen Gesichtspunkt vorzugsweise mit einem durchgehenden oder unterbrochenen halbstarren Material mit einer Dicke von mindestens 0,025 mm (0,001 Zoll) laminiert. Das Laminat bedeckt nur die Rückseite und versieht die Vorrichtung mit adäquater mechanischer Festigkeit, d. h. es versieht das poröse Material und die gesamte Vorrichtung mit Halte- und Festigkeitsscharakteristika.

[0051] In einem zweiten Gesichtspunkt ermöglicht das für den separaten Markierungsreagens-Bereich verwendete Material die retardierte Freisetzung des Indikatormarkierungsreagens, während das für den Analytnachweisbereich verwendete Material für eine schnelle Freisetzung des Indikatormarkierungsreagens sorgt.

[0052] Die Erfindung stellt außerdem eine immunchromatographische Vorrichtung, wie sie in Anspruch 5 oder Anspruch 6 dargelegt ist, und ein Verfahren zum Ermitteln des Vorliegens oder Fehlens eines Analyten in einer Probe, wie es in einem der Ansprüche 7 bis 15 dargelegt ist, bereit.

Definitionen

[0053] Der Ausdruck „Analyt“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Verbindung oder Zusammensetzung, die in der Testprobe nachgewiesen oder gemessen werden soll. Der Analyt wird mindestens ein Epitop aufweisen, das ein Antikörper oder ein immunologisch reaktives Fragment davon erkennen kann. Analyt kann beliebige antigene Substanzen, Haptene, Antikörper und Kombinationen davon beinhalten. Der Analyt von Interesse in einem Assay kann beispielsweise ein Protein, ein Peptid, eine Aminosäure, ein Steroid, ein Vitamin, ein pathogener Mikroorganismus, für den polyklonale und/oder monoklonale Antikörper produziert werden können, ein Kontaminant, ein Arzneimittel, einschließlich jener, die zu Therapiezwecken verabreicht werden, sowie jener, die zu gesetzeswidrigen Zwecken verabreicht werden, und Metaboliten einer beliebigen der obigen Substanzen oder Antikörper zu einer beliebigen der obigen Substanzen sein. Ein bevorzugtes Beispiel eines zum Nachweis geeigneten Hormons ist humanes Choriongonadotropin („hCG“). Weitere Beispiele bevorzugter Analyten sind die pathogenen Organismen Streptococcus der Gruppe A oder B oder H. pylori. Andere Beispiele bevorzugter Analyten sind menschliche Antikörper gegen infektiöse Agenzien wie HIV (in der AIDS-Diagnose verwendet), EBV (in der Mononukleosediagnose verwendet) oder Hepatitisvirus usw. Noch weitere Beispiele bevorzugter Analyten sind menschliche Proteine wie Myoglobin, Kreatinkinase-MB, Troponin-I, Troponin-T oder Hämoglobin usw.

[0054] Der Ausdruck „Probe“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine beliebige biologische Probe, die einen Analyt zum Nachweis enthalten könnte. Vorzugsweise ist die biologische Probe in flüssiger Form oder kann in eine flüssige Form umgewandelt werden. Vorzugsweise ist die Probe eine Urinprobe oder von einem Tupfer eines Rachenabstrichs extrahiertes Material.

[0055] Wie hierin verwendet, steht der Ausdruck „Probenaufnahmebereich“ für den Abschnitt der Prüfvorrichtung, der in direktem Kontakt mit der flüssigen Probe steht, d. h. er nimmt die Probe auf, die auf den betreffenden Analyten getestet werden soll. Die flüssige Probe kann dann mittels Lateralfluss von dem Probenaufnahmebereich in Richtung des Endflussbereichs migrieren. Vorzugsweise ist der Probenaufnahmebereich der Rand der Prüfvorrichtung. Der Probenaufnahmebereich steht mit entweder dem separaten Markierungsreagens-Bereich oder dem Analytnachweisbereich in Lateralflusskontakt. Dies könnte entweder eine Überlappungs- oder eine durchgehende Verbindung sein. Der Probenaufnahmebereich kann mit Puffer imprägniert sein, um Reagenzien in der Probe während des Lateralfluss-Immunoassays zu neutralisieren.

[0056] Der Analyt in der Probe muss mittels Lateralfluss mit der flüssigen Probe migrieren können. Der Probenaufnahmebereich ist aus porösem Material, vorzugsweise porösem Papier hergestellt.

[0057] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „poröses Material“ auf ein beliebiges Material, das für Lateralfluss sorgen kann. Dies würde Material wie Nitrocellulose, Nitrocellulosegemische mit Polyester oder Cellulose, unbehandeltes Papier, poröses Papier, Viskose, Glasfaser, Acrylnitril-Copolymer oder Nylon beinhalten. Ein Fachmann wird sich anderer poröser Materialien bewusst sein, die einen Lateralfluss ermöglichen. Der Ausdruck „Lateralfluss“ bezieht sich auf Flüssigkeitsfluss, bei dem alle gelösten oder dispergierten Bestandteile der Flüssigkeit mit im Wesentlichen gleichen Geschwindigkeiten und mit verhältnismäßig unbeeinträchtigtem lateralem Fluss durch das Material getragen werden, im Gegensatz zu bevorzugter Rückhaltung eines oder mehrerer Bestandteile, wie sie z. B. in Materialien auftreten würde, die einen oder mehrere Bestandteile adsorbieren oder absorbieren können.

[0058] Der Ausdruck „mobil“, wie hierin darauf verwiesen wird, steht für diffusionsfähig oder nicht diffusionsfähig angelagert oder imprägniert. Die Reagenzien, die mobil sind, können bei Rehydratation mit der flüssigen Probe dispergieren und werden von der flüssigen Probe im Lateralfluss getragen. Der Ausdruck „immobil“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf Reagenzien, die derart an dem Träger angelagert sind, dass sich der Lateralfluss der flüssigen Probe nicht auf die Anordnung des immobilen Teilchens in dem diskreten Bereich des porösen Materials auswirkt. Eine solche Anlagerung kann über kovalente, ionische oder hydrophobe Mittel erfolgen. Fachmänner werden sich Anlagerungsmitteln zum Immobilisieren verschiedener Teilchen bewusst sein.

[0059] Der Ausdruck „Markierungsreagens“ bezieht sich auf ein geeignetes Reagens, das mit einer chromogenen teilchenförmigen Substanz, wie farbigem Latex, kolloidalem Gold, Selen oder dergleichen, markiert ist. Der Ausdruck „Markierungsreagens“ kann sich entweder auf ein Indikatormarkierungsreagens oder auf ein Kontrollmarkierungsreagens beziehen.

[0060] Der Ausdruck „Indikatormarkierungsreagens“ bezieht sich auf ein beliebiges Teilchen, Protein oder Molekül, das den betreffenden Analyten erkennt oder an diesen bindet und das an eine Substanz oder ein Teilchen konjugiert ist bzw. an dieser bzw. diesem angelagert ist, die bzw. das ein Signal produzieren kann, das mit visuellen oder instrumentellen Mitteln nachweisbar ist. Die Anlagerung an die Substanz oder das Teilchen, die bzw. das ein Signal produzieren kann, kann chemisch, kovalent oder nichtkovalent, ionisch oder nichtionogen sein. Zu solchen Markern, die ein Signal produzieren, würden Chromogene, Katalysatoren, fluoreszierende Verbindungen, kolloidale metallische und nichtmetallische Teilchen, Farbstoffteilchen, Enzyme oder Substrate, organische Polymere, Latexteilchen, Liposome mit signalproduzierenden Substanzen und dergleichen zählen. Das Teilchen oder Molekül, das den Analyten erkennt, kann entweder natürlich oder unnatürlich sein, vorzugsweise ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper.

[0061] Indikatormarkierungsreagenzien können beispielsweise ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper zu dem β -Epitop von hCG oder ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper zu dem Kohlenhydratantigen von Streptococcus der Gruppe A sein. Es ist in der Technik wohl bekannt, dass das Kohlenhydratantigen von Streptococcus der Gruppe A ein wiederholtes Epitop enthält. Folglich kann ein Sandwichkomplex gebildet werden, selbst wenn das Indikatorerfassungsreagens und das Indikatormarkierungsreagens jeweils einen Antikörper zu demselben Epitop von Strep A enthalten.

[0062] Das Indikatormarkierungsreagens kann an einen Marker wie farbigen Latex- oder Goldsolteilchen gebunden sein. Ein Durchschnittsfachmann wird ebenfalls zu schätzen wissen, dass der Marker an dem Indikatormarkierungsreagens und dem Kontrollmarkierungsreagens gleich sein kann.

[0063] Das mobile Kontrollmarkierungsreagens ist ein Teilchen oder Molekül, das nicht an das Indikatorerfassungsreagens bindet und an eine Substanz oder ein Teilchen konjugiert ist, die bzw. das ein Signal produzieren

kann. Vorzugsweise ist das Kontrollmarkierungsreagens RSA, das an einen Marker wie farbigen Latex- oder Goldsolteilchen gebunden ist.

[0064] Alternativ kann das Kontrollmarkierungsreagens dasselbe Reagens wie das Indikatormarkierungsreagens sein. In dieser Ausführungsform ist das „Kontrollerfassungsreagens“ ein Reagens, das das Kontrollmarkierungsreagens binden kann, das jedoch nicht an den Analyten oder den Komplex aus Indikatormarkierungsreagens und Analyt bindet. Zum Beispiel können das Kontrollmarkierungsreagens und das Indikatormarkierungsreagens ein Kaninchen-Anti-Strep-A-Antikörper sein, der mit einem Marker wie Goldsolteilchen verknüpft ist. In dieser Ausführungsform bindet das Erfassungsreagens für das „Kontrollmarkierungsreagens“ auch an das „Indikatormarkierungsreagens“, es bindet jedoch nicht den Analyten. Zum Beispiel kann das Kontrollerfassungsreagens für das positive Kontrollsignal ein Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Antikörper sein, während das Indikatorerfassungsreagens des Analytsignals ein Antikörper zu dem Strep-A-Antigen ist.

[0065] Ein „Markierungsteilchen“ ist ein Teilchen, das eine Substanz enthält, die ein Signal produzieren kann, das mit visuellen oder instrumentellen Mitteln nachweisbar ist, z. B. ein Farbstoffteilchen oder Latexteilchen, das einen Farbstoff enthält. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Markierungsteilchen um farbige Latexteilchen oder Goldsol.

[0066] Der Ausdruck „separater Markierungsreagens-Bereich“ bezieht sich auf einen Bereich, der Indikatormarkierungsreagens enthält. Der separate Markierungsreagens-Bereich kann auch Kontrollmarkierungsreagens enthalten. Der separate Markierungsreagens-Bereich ist vorzugsweise aus einer Mischung von Cellulose und Polyester oder einem anderen porösen Material hergestellt.

[0067] Der Ausdruck „Indikatorerfassungsreagens“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein beliebiges Teilchen oder Molekül, das den betreffenden Analyten erkennt oder bindet. Das Indikatorerfassungsreagens kann einen Bindungskomplex mit dem Komplex bilden, der durch die Bindung des Analyten an das Indikatormarkierungsreagens bzw. die Indikatormarkierungsreagenzien gebildet wurde. Das Indikatorerfassungsreagens ist an dem porösen Material des Analytnachweisbereichs immobilisiert.

[0068] Das Erfassungsreagens ist immobil, d. h. wird aufgrund der Immobilisierung an dem porösen Material nicht vom Lateralfloss der flüssigen Probe beeinflusst. Das Teilchen des Moleküls des Indikatorerfassungsreagens kann natürlich oder unnatürlich, d. h. synthetisch sein. Sobald das Indikatorerfassungsreagens den Komplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens bzw. Indikatormarkierungsreagenzien bindet, hindert es den Komplex aus Analyt und Markierungsreagens daran, mit dem Lateralfloss der flüssigen Probe fortzufahren.

[0069] Der Ausdruck „Kontrollerfassungsreagens“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein beliebiges Teilchen oder Molekül, das das Kontrollmarkierungsreagens binden kann, das den betreffenden Analyten in der Probe nicht erkennt oder bindet. Zum Beispiel kann das Kontrollerfassungsreagens RSA sein, das an einen Marker, wie farbige Latex-, Goldsolteilchen oder andere in der Technik bekannte Marker, konjugiert ist.

[0070] Der Ausdruck „Erfassungsreagens“ kann sich auf entweder das Indikatorerfassungsreagens oder das Kontrollerfassungsreagens beziehen. Das Erfassungsreagens kann in einer beliebigen gewünschten geometrischen Form auf das poröse Material aufgebracht werden.

[0071] In einer bevorzugten Ausführungsform wäre das Kontrollerfassungsreagens ein Teilchen oder Molekül, das das RSA erkennt oder bindet, das an das Markierungsreagens konjugiert ist. Vorzugsweise wäre das Kontrollerfassungsreagens ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der RSA erkennt. Genauso wie das Indikatorerfassungsreagens in einem diskreten Ort auf dem porösen Material des Analytnachweisbereichs immobilisiert wird, wird das Kontrollerfassungsreagens ebenfalls in einem diskreten Ort auf dem porösen Material des Analytnachweisbereichs immobilisiert. Sobald es das Kontrollmarkierungsreagens bindet, immobilisiert es das Kontrollmarkierungsreagens und hindert es daran, den Lateralfloss mit der flüssigen Probe fortzusetzen. Die Bindung des immobilisierten Kontrollerfassungsreagens an das Kontrollmarkierungsreagens resultiert in der Bildung eines positiven Kontrollsignals, das als eine interne Kontrolle dient, dass der Assay korrekt durchgeführt wurde.

[0072] Der Ausdruck „Clearance-Zeit“ bezieht sich auf die Zeit, die dafür benötigt wird, dass eine ausreichende Menge an ungebundenem Indikatormarkierungsreagens durch die Erfassungszone fließt, so dass der Hintergrund im Vergleich zu den Erfassungszonenbandstärken ausreichend reduziert wird, um eine präzise Ableitung der positiven und negativen Ergebnisse zu ermöglichen. Ungebundenes Indikatormarkierungsreagens in

der Erfassungszone kann zu einem stärkeren Hintergrund und mehr falschen Positiven führen. Die Clearance-Zeit gibt die Zeit wieder, die benötigt wird, um den Assay abzuschließen.

[0073] Der Ausdruck „Analytnachweisbereich“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf den Abschnitt der Prüfvorrichtung, der in Lateralflusskontakt mit dem Endflussbereich und entweder dem porösen Material des Probenaufnahmebereichs oder dem porösen Material des separaten Markierungsreagens-Bereichs steht. Der Kontakt kann eine Überlappungs- oder durchgehende Verbindung sein. Der Analyt in der Probe muss mittels Lateralfluss mit der flüssigen Probe migrieren können. Der Analytnachweisbereich ist aus einem porösen Material hergestellt, genauso wie der Probenaufnahmebereich dies ist. Vorzugsweise ist der Analytnachweisbereich aus Nitrocellulose hergestellt. Der Probenaufnahmebereich, der separate Markierungsreagens-Bereich, der Analytnachweisbereich und der Endflussbereich können aus verschiedenen Materialien hergestellt sein. Der Analytnachweisbereich kann die mobilen Markierungsreagenzien, das immobile Indikatorerfassungsreagens und das immobile Kontrollerfassungsreagens enthalten. In anderen Ausführungsformen enthält der Analytnachweisbereich nur das immobilisierte Kontrollerfassungsreagens und das Indikatorerfassungsreagens.

[0074] Der Ausdruck „diskrete Zone“, „diskreter Erfassungsort“ oder „diskreter Kontrollort“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein definiertes Gebiet, in dem entweder die Markierungsreagenzien, das Indikatorerfassungsreagens oder das Kontrollerfassungsreagens imprägniert (für die Indikatormarkierungsreagenzien und Kontrollmarkierungsreagenzien) oder an dem porösen Material immobilisiert (für das Kontrollerfassungsreagens oder das Indikatorerfassungsreagens). Der diskrete Erfassungsort des Kontrollerfassungsreagens oder des Indikatorerfassungsreagens für den Analyten liefert ein diskretes sichtbares Signal in einer gewünschten geometrischen Form, aus dem die Ergebnisse des Tests ersehen werden können. Wenn beispielsweise das eine Markierungsreagens ein Analyt ist, der an einen Anti-Analyten gebunden ist, der an einen Marker aus blauem Latex konjugiert ist, wird an dem diskreten Erfassungsort ein diskretes blaues Signal auftreten, wenn das Indikatorerfassungsreagens den Komplex aus Analyt und Markierungsreagens bindet und immobilisiert. Wenn das Kontrollmarkierungsreagens RSA ist, das an einen Marker wie farbiger Latex oder Goldsol konjugiert ist, wird sich an dem diskreten Kontrollort ein diskretes Signal bilden, wenn das Kontrollerfassungsreagens den Komplex aus RSA und Kontrollmarkierungsreagens immobilisiert hat.

[0075] Der Ausdruck „Endflussbereich“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf den Abschnitt der Prüfvorrichtung, der in Lateralflusskontakt mit dem Analytnachweisbereich steht. Die flüssige Probe migriert zu dem Endflussbereich. Er kann überschüssige flüssige Probe absorbieren. Der Kontakt mit dem Analytnachweisbereich kann entweder mittels Überlappungs- oder durchgehender Verbindung sein. Dieser Bereich ist aus porösem Material, für gewöhnlich porösem Papier hergestellt.

[0076] Der Ausdruck „obere“ bezieht sich auf die oberen Flächen der Bereiche der Vorrichtung, z. B. die obere Fläche des Teststreifens.

[0077] Der Ausdruck „halbstarr“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf das Material, das zum Tragen des porösen Materials der Vorrichtung verwendet wird. Dabei kann es sich um ein durchgehendes Laminatstück oder separate Stücke handeln. Das Laminat ist vorzugsweise ein Vinylkunststoff ein Fachmann wird jedoch erkennen, dass zahlreiche Materialien verwendet werden können, um den halbstarren Träger bereitzustellen, der vorzugsweise mindestens 0,025 mm (0,001 Zoll) dick ist. Dies beinhaltet Polyester, Polycarbonat, Methylmethacrylat-Polymer, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen und Wachskarton. Das halbstarre Material muss mindestens 0,025 mm (0,001 Zoll) dick sein, um die gewünschte adäquate mechanische Festigkeit oder den gewünschten adäquaten Rückhalt hervorzubringen, damit die Vorrichtung wirksam funktioniert.

[0078] Der Ausdruck „adäquate mechanische Festigkeit“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen gewünschten Rückhalt der Prüfvorrichtung, damit diese ordnungsgemäß funktioniert. Die adäquate mechanische Festigkeit ist der Rückhalt, der für die gesamte zusammengebaute Prüfvorrichtung erzielt wird, damit diese bei der Sammlung und Analyse des Analyten in der flüssigen Probe ordnungsgemäß funktioniert. Die Gesamtdicke aller Schichten der Immunassayvorrichtung ist vorzugsweise eine Dicke von mindestens 0,076 mm (0,003 Zoll). Die Gesamtdicke der Immunassayvorrichtung besteht aus der Dicke der Verstärkung, der Membranelemente, Markerkissen (auf Wunsch) und der Abdeckung. Diese Mindestgesamtdicke ist erforderlich, um die gewünschte adäquate mechanische oder den gewünschten adäquaten Rückhalt hervorzubringen, damit die Vorrichtung wirksam funktioniert.

[0079] Das Laminat bedeckt nur die Rückseite und versieht die Vorrichtung mit adäquater mechanischer Festigkeit, d. h. es versieht das poröse Material und die gesamte Vorrichtung mit Halte- und Festigkeitscharakteristika, so dass der Lateralfluss von Flüssigkeit durch die Vorrichtung nicht unterbrochen wird, beispielsweise

durch das Zusammenfallen oder die Auflösung der Vorrichtung bei Benetzung. Weiterer Rückhalt für die Vorrichtung während des Immunassays kann von den Wänden eines Reagenzglases bereitgestellt werden, gegen das die Vorrichtung während des Lateralflusses ruhen kann.

[0080] Der Ausdruck „Kunststoffmaterial“ oder „Kunststoffabdeckung“ oder „Abdeckung“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein beliebiges Kunststoffmaterial, das das poröse Material der Vorrichtung bedecken kann. Dabei handelt es sich vorzugsweise um Mylar, Fachmänner werden jedoch verschiedene Materialien kennen, die zu solchen Zwecken verwendet werden können. Bei der Abdeckung kann es sich um ein durchgehendes Kunststoffstück oder separate Stücke handeln, wie in den Figuren gezeigt. Es muss ermöglichen, dass der diskrete Kontrollort und der diskrete Erfassungsort betrachtet werden können. Folglich kann das Ergebnis, wenn die Abdeckung durchsichtig ist, durch die durchsichtige Abdeckung gesehen werden. Wenn die Abdeckung nicht durchsichtig ist, muss ein Fenster, eine Lücke oder ein Loch verwendet werden, damit die Ergebnisse gesehen werden können. Darüber hinaus muss die Abdeckung einen Abschnitt des Probenaufnahmebereichs freilassen, damit die Probe auf den Aufnahmebereich aufgebracht werden kann.

[0081] Alternativ kann es sich bei der Verstärkung und der Kunststoffabdeckung um ein geformtes Kunststoffgehäuse handeln.

[0082] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden ausführlichen Beschreibung der gegenwärtig bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung in Verbindung mit den begleitenden Zeichnungen und aus den Ansprüchen ersichtlich werden.

Beschreibung der Zeichnungen

[0083] [Fig. 1](#) stellt eine erweiterte perspektivische Ansicht der immunchromatographischen Elemente dar, die in eine Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung eingebaut wurden.

[0084] [Fig. 2](#) stellt eine erweiterte perspektivische Ansicht der immunchromatographischen Elemente der vorliegenden Erfindung mit einer alternativen Anordnung des separaten Markierungsreagens-Bereichs und Markierungsreagens, das in der diskreten Zone aus dem porösen Lateralfluss-Material vorliegt, dar.

[0085] [Fig. 3](#) zeigt eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wobei sich die diskrete Zone, die Markierungsreagens enthält, auf dem separaten porösen Teil, das den Probenaufnahmebereich beinhaltet, befindet.

[0086] [Fig. 4](#) ist ein Intensitätskurvengraph, der die Intensität des Farbstoffs, der als ein Markierungsreagens verwendet wurde, das durch die Erfassungszone läuft, zu verschiedenen Zeitpunkten für drei Vorrichtungen, die unterschiedliche Anordnungen des Markierungsreagens beinhalten, zeigt.

[0087] [Fig. 5](#) ist ein Graph, der die Intensität zeigt, die an der Erfassungszone bei verschiedenen Konzentrationen des Zielanalyten für drei Vorrichtungen, die unterschiedliche Anordnungen des Markierungsreagens beinhalten, erhalten wurde. Es sind die Reflexionsstärkenwerte im Vergleich zur hCG-Konzentration gezeigt.

[0088] [Fig. 6](#) ist ein Graph, der die Intensität des Farbstoffs, der als ein Markierungsreagens verwendet wurde, das durch die Erfassungszone läuft, im Zeitablauf für hohe und niedrige Feststoffgehalte (eine Maßeinheit der Menge vorhandenen Farbstoffs) zeigt, wobei der Farbstoff nur in der Markerzone des Analytnachweisbereichs angeordnet wurde.

[0089] [Fig. 7](#) ist ein Graph, der die Intensität des Farbstoffs, der als ein Markierungsreagens verwendet wurde, das durch die Erfassungszone läuft, im Zeitablauf für hohe und niedrige Feststoffgehalte zeigt, wobei der Farbstoff nur in dem separaten Markierungsreagens-Bereich oder Markerzonen angeordnet wurde.

[0090] [Fig. 8](#) ist ein Intensitätskurvengraph, der die Intensität des Farbstoffs, der als ein Markierungsreagens verwendet wurde, das durch die Erfassungszone läuft, zu verschiedenen Zeitpunkten für drei Vorrichtungen, die unterschiedliche Anordnungen des Markierungsreagens beinhalten, zeigt. Die gleiche Gesamtmenge an Marker wurde in jeder der drei Vorrichtungen angeordnet. Bei zwei der Vorrichtungen wurde der Farbstoff entweder nur in einem Markerzonen oder nur in einer Markerzone angeordnet.

[0091] Die Hybridvorrichtung enthielt die gleiche Gesamtmenge an Marker, die zwischen dem Markerzonen und der Markerzone aufgeteilt wurde.

[0092] [Fig. 9](#) stellt eine erweiterte perspektivische Ansicht der immunchromatographischen Elemente dar, die in eine Testvorrichtung gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eingebaut wurden.

[0093] [Fig. 10](#) stellt eine erweiterte perspektivische Ansicht der immunchromatographischen Elemente dar, die in eine Testvorrichtung gemäß einer alternativen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eingebaut wurden.

[0094] [Fig. 11](#) stellt eine erweiterte perspektivische Ansicht der immunchromatographischen Elemente dar, die in eine Testvorrichtung gemäß einer anderen alternativen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eingebaut wurden.

[0095] [Fig. 12](#) stellt eine Draufsicht der Testvorrichtung, die gemäß der vorliegenden Erfindung konstruiert wurde, mit einer oberen Abdeckung, die mit Produktinformationen bedruckt wurde, dar.

[0096] [Fig. 13](#) stellt die Vermischung von Reagenzien in einem Reagenzglas dar.

[0097] [Fig. 14](#) stellt die Anordnung eines Rachtupfers in dem Reagenzglas, das die Reagenzien enthält, dar.

[0098] [Fig. 15](#) stellt die Anordnung der Vorrichtung in dem Reagenzglas, das die gelöste Probe enthält, dar.

[0099] Die [Fig. 16\(a\)–\(c\)](#) stellen die Auswertung der Ergebnisse dar.

[0100] [Fig. 16\(a\)](#) zeigt ein positives Ergebnis. Es wird durch Binden des Indikatorerfassungsreagens an den Komplex aus Indikatormarkierungsreagens und Strep A eine Testsignallinie gebildet. Es wird durch Binden des Kontrollerfassungsreagens an das Kontrollmarkierungsreagens eine positive Kontrolllinie gebildet.

[0101] [Fig. 16\(b\)](#) zeigt ein negatives Ergebnis. Es wird lediglich durch Binden des Kontrollerfassungsreagens an das Kontrollmarkierungsreagens eine positive Kontrolllinie gebildet.

[0102] [Fig. 16\(c\)](#) zeigt ein ungültiges Ergebnis. Wenn keine positive Kontrolllinie erschienen ist oder der Hintergrund zu stark ist und es nicht möglich ist, das positive Kontrollsignal zu sehen, ist das Ergebnis ungültig.

[0103] Die Zeichnungen sind nicht unbedingt maßstabsgerecht und bestimmte Merkmale der Erfindung sind in Bezug auf den Maßstab möglicherweise übertrieben dargestellt und der Deutlichkeit und Prägnanz halber in schematischer Form dargestellt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0104] Bei den folgenden handelt es sich um Beispiele der immunchromatographischen Prüfvorrichtung der vorliegenden Erfindung. Diese Beispiele werden zur Veranschaulichung angeführt und sollen die Erfindung auf keinerlei Weise einschränken.

[0105] [Fig. 1](#) stellt eine beispielhafte Ausführungsform der Erfindung bildlich dar. Eine Reihe von porösen Materialteilen (2), (3), (4) und (5) sind auf einen länglichen Streifen aus einem halbstarren Material (1), wie Vinyl und dergleichen, laminiert.

[0106] Der separate Probenaufnahmebereich (4) ist ein poröses Material, vorzugsweise Papier oder eine Mischung aus Cellulose und Polyester. In der in [Fig. 1](#) gezeigten bevorzugten Ausführungsform steht der separate Probenaufnahmebereich in direktem Flüssigkeitsflusskontakt mit dem separaten Markierungsreagens-Bereich (3). Bei diesem Kontakt kann es sich um Lateralflusskontakt handeln, wie in [Fig. 1](#) gezeigt. Alternativ kann dieser Kontakt Senkrechtflusskontakt sein, wobei der separate Probenaufnahmebereich auf dem separaten Markierungsreagens-Bereich angeordnet ist (nicht gezeigt). Der separate Markierungsreagens-Bereich steht in direktem Lateralflusskontakt mit dem Analytnachweisbereich (2). Der Analytnachweisbereich beinhaltet eine diskrete Zone, die das mobile Markierungsreagens (2a) enthält. Dieses Markierungsreagens ist das gleiche Reagens, das in dem separaten Markierungsreagens-Bereich (3) vorzufinden ist und das an den Analyten binden kann.

[0107] In der in [Fig. 9](#) gezeigten Ausführungsform steht der separate Markierungsreagens-Bereich in direk-

tem Lateralflusskontakt mit dem Analytnachweisbereich (2).

[0108] In dieser Ausführungsform enthält der Analytnachweisbereich (2) der immunchromatischen Prüfvorrichtung zwei mobile Markierungsreagenzien in einem diskreten Ort (2a), ein immobiles Indikatorerfassungsreagens in einem diskreten Ort (2b) und ein immobiles Kontrollerfassungsreagens an einem diskreten Ort (2c). Das mobile Markierungsreagens besteht aus einem ersten mobilen Markierungsreagens, das den nachzuweisenden Analyten binden kann, d. h. einem Indikatormarkierungsreagens. Vorzugsweise ist das Indikatormarkierungsreagens ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der spezifisch an den nachzuweisenden Analyten bindet. An dem Antikörper ist entweder kovalent oder nichtkovalent eine Substanz oder ein Teilchen angelagert, die bzw. das ein Signal produzieren kann, das visuell nachgewiesen wird. Solche Teilchen, die als Markierungsteilchen verwendet werden, können kolloidales Gold, Farbstoffsole, farbiger Latex und dergleichen sein. Vorzugsweise ist der Marker farbiger Latex (blau) oder Goldsol. Ein Fachmann wird geeignete Markierungsteilchen erkennen. Das zweite mobile Markierungsreagens ist ein Teilchen oder Molekül, das den Analyten nicht erkennt und an eine Substanz oder ein Teilchen konjugiert ist, die bzw. das ein Signal produzieren kann, d. h. Kontrollmarkierungsreagens. Vorzugsweise ist das Kontrollmarkierungsreagens RSA, das an farbigen Latex (rot) oder Goldsol konjugiert ist.

[0109] Das mobile Indikatormarkierungsreagens in dem Analytnachweisbereich kann das gleiche Reagens sein, das in dem separaten Markierungsreagens-Bereich (3) vorzufinden ist und das an den Analyten binden kann. Ein Streifen aus Kunststoffmaterial (5), vorzugsweise durchsichtiges Mylar, ist auf die Oberseite der Vorrichtung beschichtet. Ein Abschnitt (5a) kann ein Fenster oder durchsichtig sein, um die Betrachtung des diskreten Erfassungsbereichs und des diskreten Kontrollorts zu ermöglichen, d. h. die Betrachtung der Ergebnisse zu ermöglichen. Ein Endflussbereich (6) steht in Lateralflusskontakt mit dem Analytnachweisbereich.

[0110] In der in [Fig. 2](#) gezeigten bevorzugten Ausführungsform steht der separate Probenaufnahmebereich (4) in direktem Lateralflusskontakt mit dem Abschnitt des Analytnachweisbereichs (8), der die diskrete Zone bzw. die diskreten Zonen, die das Indikatormarkierungsreagens und das Kontrollmarkierungsreagens (8a) enthält bzw. enthalten, beinhaltet. Dieser Abschnitt des Analytnachweisbereichs steht in direktem Lateralflusskontakt mit dem separaten Markierungsreagens-Bereich (3). Der separate Markierungsreagens-Bereich steht in direktem Lateralflusskontakt mit dem Abschnitt des Analytnachweisbereichs (7), der die Erfassungszonen (7a und 7b) beinhaltet.

[0111] Der zweite Abschnitt des Analytnachweisbereichs (7) steht in direktem Lateralflusskontakt mit dem separaten Endflussbereich (5). Der Verband ist dermaßen, dass ein durchgehender Kontakt jedes Bereichs vorliegt oder Überlappungen vorliegen, die dazu ausreichen, für eine kontinuierliche Flüssigkeitstransportwirkung (d. h. kontinuierlicher Lateralfluss) zu sorgen. Ein Streifen aus Kunststoffmaterial, vorzugsweise durchsichtiges Mylar, kann auf die Oberseite der Vorrichtung beschichtet sein, wodurch ein Abschnitt des vorderen Kissens zum Probenauftrag freigelassen bleibt (nicht gezeigt).

[0112] In einem Assay, der die in [Fig. 9](#) gezeigte Vorrichtung verwendet, wird der Probenaufnahmebereich (4) der Prüfvorrichtung direkt in eine Probe gegeben, die extrahierte Analyten enthält, beispielsweise eine verarbeitete Rachentupferprobe, die extrahiertes Kohlenhydratantigen von Streptococcus der Gruppe A enthalten kann, oder ein Urinstrahl, der hCG enthalten kann. Die Probe fließt mittels Kapillarwirkung lateral den Bereich aus porösem Material entlang und migriert an dem separaten Markierungsreagens-Bereich (3) und dann an den Markierungsreagenzien in dem Analytnachweisbereich (2a) vorbei. Das Vorliegen und/oder die Menge des Analyten in der Probe kann dann über die Sichtbarkeit einer Signallinie (2b) ermittelt werden, die durch die spezifische Bindung des immobilisierten Indikatorerfassungsreagens an den Konjugatkomplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens gebildet wird.

[0113] Das Auftreten eines zweiten Signals (2c) kann als ein integriertes positives Kontrollsignal genutzt werden. Dieses positive Kontrollsignal resultiert aus der Bindung des immobilisierten Kontrollerfassungsreagens an das Kontrollmarkierungsreagens, z. B. RSA-roter Latex. Wenn die Reagenzien und der Assay ordnungsgemäß funktionieren, wird bei (2c), dem diskreten Kontrollort, eine rote Signallinie erscheinen. Die rote Kontrolllinie ist eine interne Kontrolle. Das Teststäbchen muss die korrekte Probenmenge absorbieren und das Teststäbchen muss ordnungsgemäß funktionieren, damit die rote Kontrolllinie erscheint. Damit das Teststäbchen ordnungsgemäß funktioniert, muss der Kapillarfluss erfolgen. Folglich dient die Kontrolllinie als eine Anzeige, dass die korrekte Menge an Reagenzien der Prüfkammer zugegeben wurde und dass genug Lateralfluss erfolgt ist, so dass das Kontrollmarkierungsreagens die Kontrollerfassungsreagens-Zone erreicht.

[0114] Die Ergebnisse eines Assays können dann durch ein Sichtfenster (5a), das von durchsichtigem Mylar

bedeckt ist, betrachtet werden.

[0115] In der in [Fig. 3](#) gezeigten Ausführungsform gibt es keinen separaten Markierungsreagens-Bereich. Das mobile Indikatormarkierungsreagens und das Kontrollmarkierungsreagens sind in dem Analytnachweisbereich (2a) angeordnet. Darüber hinaus kann das markierte Reagens (4a) in der Nähe eines Endes des Probenaufnahmebereichs (4) imprägniert werden.

[0116] In Ausführungsformen, in denen der Probenaufnahmebereich in direktem Kontakt mit dem Analytnachweisbereich steht, in [Fig. 2](#) dargestellt, kann der Analytnachweisbereich in zwei Abschnitte (7) und (8) unterteilt sein. In dieser Ausführungsform steht der erste Abschnitt des Analytnachweisbereichs (8) in direktem Kontakt mit dem Probenaufnahmebereich (4). Der erste Abschnitt des Analytnachweisbereichs beinhaltet eine diskrete Zone, die das mobile Indikatormarkierungsreagens und das Kontrollmarkierungsreagens (8a) enthält, und steht zudem in Lateralflyskontakt mit dem separaten Markierungsreagens-Bereich (3). Der separate Markierungsreagens-Bereich (3) steht in Kontakt mit dem zweiten Abschnitt des Analytnachweisbereichs (7), der das immobilisierte Indikatorerfassungsreagens und das Kontrollreagens, (7a) und (7b), enthält. Der zweite Abschnitt des Analytnachweisbereichs steht in direktem Flusskontakt mit dem Endflussbereich (5).

[0117] Andere Gestaltungen, z. B. der oberen Abdeckungen oder der markierten Teilchen, sind möglich, solange Lateralfly der porösen Membranen ermöglicht wird. Eine Überlappungs- oder durchgehende Verbindung kann verwendet werden, solange Lateralfly erfolgt. Alternativ können die verschiedenen Bereiche des Teststreifens auch auf einem einzigen porösen Element angeordnet werden.

[0118] Zum Beispiel können das Kontrollmarkierungsreagens und das Indikatormarkierungsreagens nur in einem Bereich des Analytnachweisbereichs angeordnet werden und der separate Markierungsreagens-Bereich kann weggelassen werden. Alternativ können das Kontrollmarkierungsreagens und das Indikatormarkierungsreagens nur in einem separaten Markierungsreagens-Bereich angeordnet werden und zusätzliches Indikatormarkierungsreagens oder Kontrollmarkierungsreagens kann aus dem Analytnachweisbereich weggelassen werden.

[0119] Folglich erhöht die vorliegende Erfindung, die eine immunchromatographische Prüfvorrichtung umfasst, den Empfindlichkeitsbereich, ohne die Clearance-Zeit zu verlängern oder das Auftreten von falschen Positiven zu vermehren. Somit können die Vorrichtungen dieser Erfindung zum Durchführen schneller, sehr empfindlicher Assays verwendet werden. Darüber hinaus begünstigt der Vorteil des Verwendens desselben grundlegenden Designs mit universaler Anwendbarkeit für verschiedene Analyten zudem die Aufgabe der erfinderischen Reduzierung.

Eine beispielhafte Prüfvorrichtung

[0120] Abmessungen und Konstruktion einer Immunassayvorrichtung wurden zuvor in der US-Anmeldung Nr. 08/444,238 (WO 96/04748), erfunden von Ching Huang und Eugene Fan, mit dem Titel „One Step Immunochromatographic Device and Method of Use“, beschrieben. Diese Vorgehensweisen können beim Zusammenetzen der Vorrichtungen dieser Erfindung unter Anwendung der folgenden Abmessungen angepasst werden. Zum Beispiel kann der Probenaufbringungsbereich verkürzt werden, um die Länge eines separaten Indikatorreagens-Bereichs unterzubringen.

Abmessungen der beispielhaften Prüfvorrichtung

Obere Abdeckung:	4 mm × 98 mm
Untere Abdeckung:	4 mm × 98 mm
Separater Markierungsreagens-Bereich:	4 mm × 5 mm
Probenaufnahmebereich:	4 mm × 20 mm
Endflussbereich:	4 mm × 56 mm
Analytnachweisbereich:	4 mm × 25 mm
Sichtfenster:	4 mm × 9 mm

(Anmerkung: Produktinformationen können auf die obere Abdeckung gedruckt werden, wie in [Fig. 12](#) gezeigt.)

[0121] Die Vorrichtung muss eine adäquate mechanische Gesamtfestigkeit aufweisen (wie oben definiert und im Folgenden erörtert), damit die Vorrichtung ohne Unterbrechung des Lateralflyses funktioniert.

Auswahl von Materialien für die beispielhafte Vorrichtung

1. Analytnachweisbereich:

[0122] Wichtige Merkmale des Materials sind dessen Fähigkeiten, Flüssigkeiten zu transportieren und Proteine zu binden. Zu beispielhaften Materialien zählen Nitrocellulose, Nylon oder dergleichen. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist das Material Nitrocellulose mit oder ohne laminierten festen Träger wie Polyester. Nitrocellulose ist von zahlreichen Anbietern leicht erhältlich.

2. Probenaufnahmebereich:

[0123] Zu geeigneten Materialien zählen Baumwolle, Cellulose, Mischfasern, Glasfaser und dergleichen. Zum Beispiel kann Papier, wie 470 und 740-E von Schleicher and Schuell, Keen, NH, USA, oder D28 von Whatman, Fairfield, NJ, USA, aufgrund seiner hohen Flüssigkeitsabsorption und Flüssigkeitstransportgeschwindigkeit gewählt werden. Ein poröseres Material wie Glasfaser Nr. 66078 von Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA, oder „POREX“ von Porex Technologies, Fairburn, GA, USA, ist zum Imprägnieren markierter Teilchen geeignet.

3. Separater Markierungsreagens-Bereich:

[0124] Ein guter Kandidat wäre ein poröses Material, das die Einfachheit der Freisetzung der imprägnierten Markierungsreagenzien aus dem Bereich ermöglicht. Zu solchen Materialien zählen Glasfaser von Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA, oder Accuwik von Pall BioSupport, Port Washington, NY, USA.

4. Verstärkungsträger:

[0125] Für die vorliegende Erfindung sind die bevorzugten Materialien durchsichtiges Mylar mit einer Dicke von etwa 0,025 mm (0,001 Zoll) bis 0,25 mm (0,010 Zoll) für die obere Abdeckung und weißes Vinyl mit einer Dicke von etwa 0,025 mm (0,001 Zoll) bis 0,75 mm (0,030 Zoll) für die untere Verstärkung. Sowohl die Mylar- als auch die Vinylage weisen auf einer Seite Klebstoff auf, um das poröse Material daran zu befestigen. Materialien wie Mylar, Polyester und Vinyl mit Klebstoff sind leicht erhältlich.

5. Markierungsreagenzien:

[0126] Eine chromogene teilchenförmige Substanz, wie farbiger Latex, kolloidales Gold, Selen oder dergleichen, wird mit einem geeigneten Reagens markiert, das für den Analyten spezifisch ist, auf den abgezielt wird. Für die vorliegende Erfindung ist die bevorzugte chromogene teilchenförmige Substanz farbiger Latex oder Goldsol. Mehr bevorzugt wird blau oder rot gefärbter Latex oder Goldsol verwendet. Latex und Goldsol sind von einer Anzahl von Quellen im Handel erhältlich.

6. Endflussbereich:

[0127] Zu geeigneten Materialien zählen Baumwolle, Cellulose, Mischfasern, Glasfaser und andere ähnliche Materialien mit hohem Flüssigkeitsabsorptionsvermögen. Zum Beispiel kann Papier, wie 470 und 740-E von Schleicher and Schuell, Keen, NH, USA, oder D28 von Whatman, Fairfield, NJ, USA, aufgrund seiner hohen Flüssigkeitsabsorption und Flüssigkeitstransportgeschwindigkeit gewählt werden.

7. Antikörper:

A. Strep-A-Antikörper: Weiße Neuseelandkaninchen wurden zum Teil gereinigtes Antigen von Streptococcus der Gruppe A injiziert. Die Kaninchen, die einen hohen Antikörpertiter produzierten, wurden mittels eines Enzym-Immunoassay-Verfahrens identifiziert. Die Seren von diesen Kaninchen wurden gesammelt und durch eine Strep-A-Antigen-Affinitätssäule gereinigt.

B. Anti-RSA-Antikörper: Affinitätsgereinigter Schaf-Anti-RSA-Antikörper wurde von Bethyl Lab, Montgomery, TX, USA, bezogen.

C. Monoklonaler Anti- β -hCG-Antikörper: Der monoklonale Anti- β -hCG-Antikörper kann von Medix Biotech (San Carlos, CA, USA), Medix Biochemica (Kauniainen, Finnland) oder anderen Handelsquellen bezogen werden. Der affinitätsgereinigte polyklonale Anti- α -hCG-Antikörper (Kaninchen) kann von Bioreclamation (East Meadow, NY, USA), H.T.I. Bio-Products, Inc. (Ramona, CA, USA), und anderen Quellen erworben werden. Wie im Folgenden erörtert wird, erkennt das Erfassungsreagens das β -Epitop von hCG, während

das Kontrollagens das α -Epitop von hCG erkennt oder umgekehrt.

8. Herstellung von Latexkonjugaten

[0128] Das allgemeine Protokoll zur Konjugation von Protein an Latex mittels einfacher Adsorption oder mittels kovalenter Bindung ist in der Technik wohl bekannt.

[0129] Zum Beispiel kann das Indikatormarkierungsreagens ein Anti-Gruppe-A-Streptococcus-Antikörper sein, der mit blauem Latex konjugiert ist, während das Indikatorerfassungsreagens ein Anti-Gruppe-A-Streptococcus-Capture-Antikörper ist.

[0130] Blaue carboxylierte Latexteilchen (0,2 bis 0,5 Mikron) wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2 % EDAC in Gegenwart von 0,1 % Sulfo-NHS in 20 mM MES-Puffer, pH 5,5, aktiviert. Die überschüssige Menge an Reagenzien wurde durch Waschen in einem Amicon-Konzentrationsapparat entfernt. Die aktivierten Latexteilchen wurden in 2 mM MES-Puffer, pH 6,5, auf eine Konzentration von 0,5 % resuspendiert und ein Verhältnis von 0,05 mg Strep-A-Antikörper wurde zu 1 mg Latex gegeben. Die Mischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der konjugierte Latex erneut gewaschen, um freien Antikörper zu entfernen. Das Konjugat aus Antikörper und Latex wurde dann mit beschallt, filtriert und in Puffer, der 50 mM Tris, pH 8,5; 20 % Saccharose; 2,0 % Casein und 0,1 Natriumazid resuspendiert.

[0131] Die Konjugation von RSA an roten carboxylierten Latex (Größe von 0,2 bis 0,5 Mikron) war im Wesentlichen genauso wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass der blaue Latex durch roten Latex und Strep-A-Antikörper durch RSA ersetzt wurde.

9. Herstellung von Latexbeschichtungslösung

[0132] Die blaue Latexlösung und die rote Latexlösung wurden in einem Verhältnis von 5:1 bis 1:1, je nach der Empfindlichkeit des Konjugats und der gewünschten Intensität der roten Kontrolllinie, gemischt. Das bevorzugte Verhältnis ist ungefähr 1:1. Diese Lösungen werden dann unter Anwendung von in der Technik wohl bekannter Verfahren in das poröse Material imprägniert.

10. Auftrag von Erfassungsreagenzien auf die diskreten Orte des Analytnachweisbereichs

[0133] Dünne Linien des Indikatorerfassungsreagens oder Kontrollererfassungsreagens wurden unter Anwendung von Farberstäubungstechniken (Iwata, Modell HP-BC2) auf das Material aufgebracht. Die Breite der Linien kann 0,2 mm bis 2 mm betragen, eine Breite von 1 mm ist bevorzugt. Derartiges Material wird mittels in der Technik wohl bekannter Techniken immobilisiert.

11. Auftrag- von Latexkonjugat (Markierungsreagenzien) auf den Analytnachweisbereich

[0134] Sofort nach den Erfassungsreagenzien wurden diese auf das Material aufgebracht. Die Latexlösung kann unter Anwendung von Farberstäubungstechniken, wie BioDot Biodoser-Gerät von Bio-Dot, Inc., Irvine, CA, USA, auf das Material aufgebracht werden. Der Membranstreifen wird dann 45 Minuten bei 70 °C in einem Umluftofen getrocknet. Ein solches Aufbringen ermöglicht, dass die Markierungsreagenzien mobil sind.

12. Herstellung eines separaten Markierungsreagens-Bereichs

[0135] Der separate Markierungsreagens-Bereich wird mittels Sättigens eines Teils aus porösem Material, wie Accuwik, mit der hergestellten Latexbeschichtungslösung hergestellt. Die Latexlösung, die das Indikatormarkierungsreagens für den Analyten enthält, wird in einem Sättigungsvolumen auf ACCUWIK™ AW14-20S4 (Pall BioSupport, Pan Washington, NY, USA) aufgebracht und dann 30 Minuten bei 70 °C in einem Umluftofen getrocknet. Mittels dieses Verfahrens aufgebracht Markierungsreagens wird mobil bleiben.

13. Herstellung eines Probenaufnahmebereichs

[0136] In dieser Erfindung kann der Probenaufnahmebereich nicht nur flüssige Probe absorbieren und transponieren, er kann auch als eine Mustersammeleinrichtung und als ein Puffermittel oder Neutralisationsmittel für eine saure Extraktionslösung fungieren. Der Probenaufnahmebereich kann ein Papier umfassen, das mit Puffer, Detergentien, Blockierungsproteinen und dergleichen behandelt wurde, um die Bewegung von getrockneten Latexteilchen zu erleichtern oder die unspezifische Bindung des Assays zu verringern. Im Fall des

Strep-A-Assays wurde 740E-Papier in einer Pufferlösung getränkt, getrocknet und dann in die Prüfvorrichtung eingebaut. Insbesondere wurde Pufferlösung verwendet, die 1,5 % Zwittergent 3-12, 0,1 % Natriumazid, 0,1 % Kaninchen-gamma-Globulin, 0,1 M NaCl und 0,2 M Tris, pH 9,0, enthielt.

[0137] Im Fall des hCG-Assays wurde eine adäquate Menge an Pufferlösung auf den separaten Markierungsreagens-Bereich (Markierungskissen) gegeben, getrocknet und dann in die Prüfvorrichtung eingebaut. Insbesondere wurden 0,4 ml Pufferlösung, die 4 Zwittergent 3-12, 1 % Kaninchen-gamma-Globulin, 1 % Casein und 200 mM Tris, pH 8,5, enthielt, auf einen 254 mm langen Streifen des vorderen Kissens an dessen Rand aufgebracht. Der Probenaufnahmebereich wird dann 15 Minuten bei 70 °C in einem Umluftofen getrocknet.

14. Zusammensetzen der Prüfvorrichtung

[0138] Eine Platte aus weißem Vinyl (98 mm × 254 mm) wird auf einer flachen Oberfläche abgelegt. Das Deckpapier auf der Platte aus weißem Vinyl wird abgezogen, um den Klebstoff freizulegen. Ein Streifen des Analytnachweisbereichs (25 mm × 254 mm), der Latex und Antikörperlinien enthält, wird an der Platte aus weißem Vinyl angebracht. Ein Streifen des Probenaufnahmebereichs (20 mm × 254 mm) wird am linken Rand der Platte aus weißem Vinyl angebracht. Ein separater Markierungsreagens-Bereich (5 mm × 254 mm) wird zwischen den Probenaufnahmebereich und die Platte aus weißem Vinyl geschichtet. Die inneren Enden des separaten Markierungsreagens-Bereichs und des Probenaufnahmebereichs liegen bündig auf und überlappen den Analytnachweisbereich um 1,5 mm. Der Endflussbereich (56 mm × 254 mm) wird am rechten Rand der Platte aus weißem Vinyl angebracht, wobei sie etwa 1,5 mm auf die Oberseite des Analytnachweisbereichs überlappt. Das Deckpapier der Platte aus durchsichtigem Mylar wird entfernt (98 mm × 254 mm), um den Klebstoff freizulegen. Während der Fensterbereich der Platte aus durchsichtigem Mylar über den Erfassungsreagenlinien im Analytnachweisbereich zentriert wird, wird die Platte aus durchsichtigem Mylar mit der Klebstoffseite nach unten auf dem Endflussbereich, dem Analytnachweisbereich und dem Probenaufnahmebereich angebracht. Die gesamte Platte wird mit einer Walze gepresst, um sicherzustellen, dass die Laminierung verlässlich ist. Die laminierte Platte wird dann in 4 mm breite Stäbchen geschnitten.

[0139] In noch einem anderen Gesichtspunkt verringert die vorliegende Erfindung, die eine immunchromatographische Prüfvorrichtung ohne geformte Kunststoffkästen umfasst, die Kosten der Herstellung erheblich. Darüber hinaus begünstigt der Vorteil des Verwendens desselben grundlegenden Designs mit universaler Anwendbarkeit für verschiedene Analyten zudem die Aufgabe der erfinderischen Reduzierung.

BEISPIEL 1 – In einem Schritt laufender Immunassay auf Strep A, der keine Probenmanipulation erfordert

[0140] Am meisten bevorzugt wird die in einem Schritt arbeitende Prüfvorrichtung einen OSOMTM-Strep-A-Test beinhalten. Der OSOMTM-Strep-A-Test weist entweder lebensfähige oder nicht lebensfähige Organismen von Streptococcus der Gruppe A direkt aus einem Rachentupfer nach, wobei innerhalb von 5 Minuten Ergebnisse geliefert werden.

[0141] Muster können mit einem sterilen Tupfer von den Mandeln und/oder dem hinteren Teil des Rachens gesammelt werden, wobei darauf zu achten ist, dass die Zahn-, Zahnfleisch-, Zungen- oder Wangenoberflächen umgangen werden. Sterile Tupfer können zum Sammeln der Muster verwendet werden. Vorzugsweise wird ein steriler Rayon- oder Dacron-Tupfer zum Sammeln von Mustern eingesetzt. Alternativ können auch Tupfer mit Transportröhrchen, die flüssiges Medium enthalten, verwendet werden. Vorzugsweise wird das in Transportröhrchen verwendete flüssige Medium modifiziertes Stuarts Transportmedium sein („CULTURETTE“, von Becton Dickinson erhältlich).

[0142] Der OSOMTM-Strep-A-Test kann zum qualitativen Nachweis von Antigenen von Streptococcus der Gruppe A aus Rachentupfern oder zur Bestätigung von mutmaßlichen Kolonien von Streptococcus der Gruppe A, die aus Kultur gewonnen wurden, verwendet werden.

[0143] Die wie beschriebenen Assays stellen ein Verfahren zur Antigenextraktion aus der Probe und Einführung der Vorrichtung in die Probe, die extrahierte Analyten enthält, ohne Erfordernis der Mustermanipulation nach der Extraktion bereit. Dies bietet dem Benutzer einen Vorteil eines schnelleren und zweckmäßigeren Testverfahrens.

Testverfahren zum Ausführen des OSOM-Strep-A-Tests:

[0144] Unmittelbar vor dem Testen wurden 3 Tropfen Reagens 1 (2 M Natriumnitrit) (rosa) und 3 Tropfen Re-

agens 2 (0,3 M Essigsäure) in das Reagenzglas gegeben (die Lösung sollte in hellgelb umschlagen). Der Tupfer (PyrFybr Inc., Munster, IN, USA) wurde sofort in das Reagenzglas eingeführt. Die Lösung wurde heftig gemischt, indem der Tupfer mindestens zehn Mal kräftig gegen die Seite des Reagenzglases gedreht wurde. (Die besten Ergebnisse wurden erhalten, wenn das Muster in der Lösung energisch extrahiert wurde.) Die Proben wurden eine Minute lang stehen gelassen. So viel Flüssigkeit wie möglich wurde aus dem Tupfer heraus gedrückt, indem der Tupfer kräftig gegen die Seite des Reagenzglases gedrückt wurde. Der Tupfer wurde verworfen. Dann wurde ein OSOM™-Strep-A-Test-Stäbchen in der extrahierten Probe angeordnet. Die Ergebnisse wurden nach 5 Minuten abgelesen.

Vergleich der Empfindlichkeit der Ergebnisse des OSOM™-Assays auf Streptococcus der Gruppe A mit anderen in einem Schritt arbeitenden Assayverfahren:

[0145] Strep-A-Zellen wurden aus einer Reinkulturplatte aufgenommen und in Kochsalzlösung suspendiert. Anschließend Reihenverdünnungen wurden mit Kochsalzlösung vorgenommen, um unterschiedliche Konzentrationen der Zellsuspension zu erzielen. Die Zellkonzentration wurde mittels des Verfahrens optischer Dichte ermittelt. OD₆₅₀ von 1 entspricht ungefähr 2×10^9 Zellen/ml in Suspension. 25 µl der Suspension wurden auf die Spitze jedes der Tupfer pipettiert, die von den Herstellern geliefert wurden. Die Tests wurden innerhalb von 5 Minuten, nachdem die Tupfer mit Zellsuspension versetzt wurden, durchgeführt. Die Tests wurden anhand der folgenden Vorgehensweise durchgeführt, die in der Anleitungsbeilage jedes potenziellen Herstellers beschrieben wurde.

Ergebnisse:

Zellmenge/Tupfer	4×10^7	4×10^6	8×10^5	4×10^5
Wyntek OSOM™	Positiv	Positiv	Schwach positiv	Schwach positiv
Quidel	Positiv	Positiv	Schwach positiv	Negativ
Binax	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ

[0146] Diese Ergebnisse zeigen, dass der OSOM™-Strep-A-Test von Wyntek Zellen von Streptococcus der Gruppe A nachweisen kann, wenn sie in einer Konzentration von nur 4×10^5 Zellen pro Tupfer vorliegen, während die Tests von Quidel und Binax Strep-A-Zellen nur nachweisen, wenn sie in einer Konzentration von 8×10^5 Zellen pro Tupfer bzw. 4×10^6 Zellen pro Tupfer vorliegen.

Leistung von OSOM™-Strep-A-Test in klinischen Versuchen

[0147] In einer Evaluierung in mehreren Zentren wurden insgesamt 639 Rachentupfer von Patienten, die Rachenschleimhautentzündung aufwiesen, gesammelt. Jeder Tupfer wurde auf eine Schaf-Blutagar-Platte inokuliert, dann mittels des OSOM-Strep-A-Tests geprüft. Die Platten wurden 18-24 Stunden bei 35-37 °C und 5-10 % CO₂ mit einer Bacitracin-Scheibe inkubiert. Mutmaßliche GAS-Kolonien wurden mit im Handel erhältlichen Strep-A-Testkits bestätigt.

[0148] Von den insgesamt 639 Mustern wurden mittels Kultur 464 als negativ bestimmt und anhand des OSOM-Strep-A-Tests waren ebenfalls 464 negativ, bei einer Spezifität von 97,8 %. Von den 175 Mustern, die mittels Kultur als positiv bestimmt wurden, waren 168 ebenfalls anhand des OSOM-Strep-A-Tests positiv, bei einer Spezifität von 96,0 %. Die Konfidenzintervalle von 95 % wurden als 96,6-99,0 % für die Spezifität und 94,4-97,6 % & für die Empfindlichkeit berechnet. Die Gesamtübereinstimmung zwischen Kultur und dem OSOM-Strep-A-Test war 97,3 % (622/639).

Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

Kulturklassifizierung	OSOM/Kultur	% korrekt
Negativ (Spezifität)	454/464	97,8 %
1+ (≤ 10 Kolonien)	3/6	50,0 %
2+ (11 - 50 Kolonien)	9/13	69,2 %
3+ (> 50 Kolonien)	44/44	100 %
4+ (überwiegendes Wachstum)	112/112	100 %
Insgesamt positiv (Empfindlichkeit)	168/175	96,0 %
Insgesamt (Gesamtübereinstimmung)	622/639	97,3 %

[0149] Darüber hinaus wurde der OSOM-Strep-A-Test zum Bestätigen der Identifizierung von Streptococcus der Gruppe A auf Blutagarplatten verwendet. Als ein Kulturbestätigungstest war der OSOM-Strep-A-Test zu 100 % empfindlich (62/62) und zu 100 % spezifisch (39/39).

[0150] Die folgenden Organismen, die in Konzentrationen von ungefähr 1×10^8 Organismen/-Test geprüft wurden, wurden als negativ bestimmt, als sie mit dem OSOM-Strep-A-Test getestet wurden:

Streptococcus der Gruppe B
 Streptococcus der Gruppe C
 Streptococcus der Gruppe F
 Streptococcus der Gruppe G
 Streptococcus pneumoniae
 Streptococcus sanguis
 Streptococcus mutans
 Staphylococcus aureus

Enterococcus faecalis

Staphylococcus epidermidis
 Corynebacterium diphtheria
 Serratia marcescens
 Candida albicans
 Klebsiella pneumoniae
 Bordetella pertussis
 Neisseria meningitidis
 Neisseria gonorrhoeae
 Neisseria sicca
 Neisseria subflava
 Branhamella catarrhalis
 Hemophilus influenza

Pseudomonas aeruginosa

Beispiel 2: Vorgehensweise zum Testen des Vorliegens oder Fehlens von humanem Choriongonadotropin (hCG) in flüssigen Proben

[0151] Proben, die hCG enthielten, wurden auf den Probenaufnahmebereich der Prüfvorrichtung aufgebracht. Die Vorrichtung wird dann auf ein Papierhandtuch gelegt. Innerhalb einer Minute wird das Testergebnis, falls auf hCG positiv, als eine blaue Linie, zusammen mit einer roten Linie, erscheinen. Wenn nur eine rote Linie erscheint, sind die Ergebnisse negativ. Der rote Latex wird als eine Kontrolle verwendet, um sicherzustellen, dass die Assayreagenzien funktionieren und dass Lateralfuss erfolgt.

Ermittlung von Clearance-Zeiten und relativen Empfindlichkeiten

[0152] Drei Arten von Vorrichtungen wurden zusammengesetzt: (1) Vorrichtungen, bei denen Markierungsreagens (in diesem Beispiel als ein Marker bezeichnet) nur in einem separaten Markierungsreagens-Region (in diesem Beispiel als ein Markerkissen bezeichnet) angeordnet wurde; (2) Vorrichtungen, bei denen Markerreagens nur in einer diskreten Markierungszone des Analytnachweisbereichs (in diesen Beispielen als die Markerzone bezeichnet) angeordnet wurde; und (3) eine Hybridvorrichtung, in der Markierungsreagens in sowohl der Markerzone als auch dem Markerkissen angeordnet wurde (in diesen Beispielen als „das Hybrid“ bezeichnet). Die Streifen in dreifacher Ausführung wurden mittels Aufbringen einer negativen Kontrollprobenlösung auf das Probenkissen laufen gelassen. Die Farbentwicklung an der Erfassungszone wurde mit dem CR-241 in 30-Sekunden-Intervallen für ungefähr 10 Minuten gemessen.

[0153] Die Intensität des Reflexionsvermögens (der E-Werte) an der Erfassungszone wurde zu verschiedenen Zeitpunkten unter Verwendung eines Minolta Chroma Meter CR-241 aufgezeichnet.

[0154] Tabelle 1 zeigt die Intensitäten (E) an der Erfassungszone zu verschiedenen Zeitpunkten für die drei Arten von Vorrichtungen. Die Hybridvorrichtung enthält die gleiche Farbstoffmenge in dem Markerkissen wie die Vorrichtung, die Farbstoff nur in dem Markerkissen enthält; die Hybridvorrichtung enthält außerdem die gleiche Farbstoffmenge in der Markerzone wie die Vorrichtung, die Farbstoff nur in der Markerzone enthält.

Tabelle 1

Zeit (min)	E-Werte		
	Nur Markerkissen	Nur Markerzone	Hybrid
0,50	1,64	1,55	1,56
1,00	1,63	1,49	1,48
1,50	6,36	15,01	14,75
2,00	9,75	9,65	15,02
2,50	10,2	8,45	15,19
3,00	10,3	7,97	13,88
3,50	9,82	7,25	12,97
4,00	9,66	7,09	12,1
4,50	9,42	6,87	11,58
5,00	9,49	6,67	10,91
5,50	9,81	6,48	10,12
6,00	8,27	5,72	9,16
6,50	7,31	5,98	8,7

7,00	7,26	6,02	8,33
7,50	7,2	6,06	8,14
8,00	7,05	6	7,95
8,50	6,1	6,02	7,84
9,00	6,1	6,02	7,75
9,50		6,06	7,74
10,00		5,96	7,73
10,50			7,74
11,00			
11,50			
12,00			

[0155] Wenn die Probe aufgebracht wird, mobilisiert der Lateralfluss das Markierungsreagens. Wenn das Reagens beginnt, die Erfassungszone zu durchlaufen, nimmt die gemessene Intensität zu. Da ein Teil des Markierungsreagens mobilisiert ist, beginnt die Menge an Markierungsreagens, die in dem separaten Markierungsreagens-Bereich und/oder in der diskreten Zone verbleibt, abzunehmen. Nach und nach beginnt die Menge an Markierungsreagens, die die Erfassungszone durchläuft, anzunehmen, bis sie genug abfällt, um eine präzise Ablesung der positiven und negativen Ergebnisse zu ermöglichen. Die Clearance-Zeit ist ein wichtiger Faktor beim Ermitteln der Zeit, die zum Abschließen des Assays erforderlich ist.

[0156] [Fig. 4](#) zeigt einen Graphen der Intensität an der Erfassungszone im Vergleich zu der Zeit in Minuten. Wie aus dem Graphen erkannt werden kann (□-□), resultiert die Anordnung des Markierungsreagens nur in der diskreten Zone in einem schnellen Anstieg der Konzentration des Markierungsreagens, die die Erfassungszone durchläuft, worauf eine schnelle Abnahme folgt. Diese Art von Vorrichtung weist eine schnelle Clearance-Zeit, jedoch eine geringere Empfindlichkeit auf – die Zeit, die der Analyt zum Binden an das Indikatormarkierungsreagens benötigt, und die Zeit, die der Komplex aus Analyt und Indikatorreagens zum Binden an das Erfassungsreagens benötigt, sind kürzer –, wie in [Fig. 5](#) gezeigt (□-□). Während der Nachweis von niedrigen Analytkonzentrationen mittels Anhebens der Markierungsreagensmenge in der diskreten Zone verbessert werden kann, erhöht dies zudem die maximale Konzentration des Markierungsreagens, die durch die Erfassungszone läuft (siehe [Fig. 6](#)), was das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen vermehren kann (Daten nicht gezeigt).

[0157] Alternativ resultiert die Anordnung des Markierungsreagens nur in dem separaten Markierungsreagens-Bereich (in diesem Beispiel ein „Markerkissen“) in einem langsamen Anstieg der Konzentration des Markierungsreagens, die durch die Erfassungszone läuft, worauf eine langsame, schleppende Abnahme der Menge des Markierungsreagens, die durch die Erfassungszone läuft, folgt ([Fig. 4](#), ◆-◆). Ein Erhöhen der Menge des Markierungsreagens in dem separaten Markierungsreagens-Bereich, um die Menge des Markierungsreagens zu erhöhen, die die Erfassungszone durchläuft, resultiert in längeren Clearance-Zeiten, einer längeren Zeit, die der Analyt zum Binden an das Indikatormarkierungsreagens benötigt, und einer längeren Zeit, die der Komplex aus Analyt und Indikatorreagens zum Binden an das Erfassungsreagens benötigt, was in einer retardierten Freisetzung und einer höheren Empfindlichkeit resultiert ([Fig. 7](#)).

[0158] Die Anordnung des Markers in sowohl der Markerzone als auch einem separaten Markierungsreagens-Bereich in der „Hybrid“-Vorrichtung hat einen schnellen Anstieg der Konzentration des Markers, der sich entlang der Erfassungszone bewegt, zur Folge ([Fig. 4](#), ▲-▲). Da das Markierungsreagens auch in einem separaten Markierungsreagens-Bereich angeordnet wird, dauert diese hohe Konzentration des Markierungsreagens einen längeren Zeitraum an, als wenn das Markierungsreagens allein in der Markerzone angeordnet wird, was eine längere Inkubation des Indikatormarkierungsreagens mit dem Analyten und eine längere Inkubation des Komplexes aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens mit dem Indikatorerfassungsreagens ermöglicht. Die Gesamtmenge des Komplexes aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens, die durch die Erfassungszone läuft, wird dadurch erhöht, was einen höheren Empfindlichkeitsbereich der Prüfvorrichtung ermöglicht. Obwohl jedoch der Empfindlichkeitsbereich erhöht wird, übersteigt die maximale Konzentration des Markers, die durch die Erfassungszone läuft, zu einem beliebigen gegebenen Zeitpunkt die maximale Konzentration nicht, die bei

der Anordnung des Markers in nur der diskreten Zone erhalten wird. Folglich erhöht die Anordnung des Markierungsreagens in beiden Positionen die Empfindlichkeit in Bezug auf die Anordnung des Markierungsreagens in einer diskreten Zone, ohne das Auftreten von falsch-positiven Ablesungen zu vermehren. Des Weiteren wird die Zeit, die benötigt wird, bis die Konzentration des Markers auf Hintergrundniveau fällt, im Vergleich zu der Vorrichtung, die den Marker allein in dem separaten Markierungsreagens-Bereich enthält, nicht erheblich. Somit wird die Clearance-Zeit nicht beeinträchtigt.

Empfindlichkeitskurve

[0159] Proben, die unterschiedliche Mengen des Zielanalyten (hCG) enthielten, wurden auf dieselben, oben beschriebenen drei Arten von Prüfvorrichtungen aufgebracht und es wurde wie beschrieben vorgegangen. Die Intensität der Bande, die sich in der Erfassungszone mittels Bindung des Komplexes aus (hCG)-Anti- β -hCG-Antikörper und blauem Latex an Anti- α -hCG-Antikörper-Erfassungsreagens bildete, wurde bei jeder hCG-Konzentration gemessen. Die Daten sind in Tabelle 2 gezeigt.

TABELLE 2

hCG-Konzentration (mIE/ml)	Nur Markerkissen	Nur Markerzone	Hybrid
15	1,54	0,51	2,36
30	3,98	1,23	5,2
62,5	7,87	1,62	6,84
125	10,15	2,52	8,82
250	10,57	4,92	14,63
500	12,11	7,68	23,49
2000	13,81	10,2	26,51
20.000	15,96	14,81	22,99
200.000	8,1	11,51	19,28
2.000.000	1,86	4,77	8,2

[0160] [Fig. 5](#) zeigt einen Graphen der Intensität im Vergleich zu der hCG-Konzentration in mIE/ml.

[0161] Bei niedrigen Konzentrationen weist die Vorrichtung, die das Markierungsreagens in einer diskreten Markerzone enthält, die niedrigste Empfindlichkeit auf ([Fig. 5](#), □-□). Die „Hybrid“-Vorrichtung hat eine Empfindlichkeit, die bei hCG-Konzentrationen von weniger als 100 mIE/ml hCG mit der Anordnung des Indikatorreagens allein in dem separaten Markierungsreagens-Bereich vergleichbar ist (◆-◆), während das Hybrid bei Konzentrationen von mehr als 100 mIE/ml hCG die höchste Empfindlichkeit aufweist (▲-▲).

Vergleich von hohem mit niedrigem prozentualen Feststoffgehalt (Markierungsreagenskonzentration) in einem separaten Markierungsreagens-Bereich (Markerkissen) und Vergleich von hohem mit niedrigem prozentualen Feststoffgehalt (Markierungsreagenskonzentration) in einer diskreten Markierungszone des Analytnachweisbereichs (Markerzone)

[0162] Prüfstreifen wurden wie oben beschrieben mit zwei unterschiedlichen Markerkonzentrationen im Markerkissen und zwei unterschiedlichen Markerkonzentrationen, die in der diskreten Zone des Analytnachweisbereichs angeordnet wurden, zusammengesetzt. Die niedrigen Markerkonzentrationen im Markerkissen und in der Markerzone waren vom prozentualen Gesamtfeststoffgehalt her gleich. Die hohen Markerkonzentrationen im Markerkissen und in der Markerzone waren ebenfalls vom Gesamtfeststoffgehalt her gleich. Der Gesamtfeststoffgehalt in der hohen Konzentration war ungefähr das Doppelte vom Gesamtfeststoffgehalt in den niedrigen Konzentrationen. Wie in den obigen Versuchen wurden Prüfstreifen mit nur Markerkissen, nur Markerzone und Hybrid (sowohl Markerkissen als auch Markerzone) zusammengesetzt. Die Streifen in dreifacher Ausführung wurden mittels Aufbringen einer negativen Kontrollprobenlösung auf das Probenkissen laufen

gelassen. Die Farbentwicklung an der Erfassungszone wurde mit dem CR-241 in 30-Sekunden-Intervallen für ungefähr 10 Minuten gemessen. Die E-Werte wurden für jedes Zeitintervall gemessen und sind in Tabelle 3 angeführt.

TABELLE 3

Zeit (min)	E-Werte				Hybrid
	Markerzone		Markerkissen		
	Niedriger %	Hoher %	Niedriger %	Hoher %	
0,50	2	2	2	2	2
1,00	12,96	35,63	3,48	8,5	14,55
1,50	3,99	6,11	5,42	12,63	16,92
2,00	3,18	4,29	5,31	14,52	15,89
2,50	2,92	3,48	5	14,81	13,78
3,00	2,75	3,05	4,79	14,26	12,57
3,50	2,54	2,78	4,72	13,91	11,58
4,00	2,3	2,61	5,03	12,66	10,21
4,50	2,15	2,53	5,18	12,02	9,06
5,00	2,09	2,47	4,29	11,68	8,57
5,50	2,04	2,42	3,54	11,33	8,04
6,00	1,99	2,38	3,16	10,95	7,85
6,50	1,97	2,32	2,93	10,42	7,71
7,00	1,94	2,18	2,79	9,73	7,5
7,50	1,93	2,09	2,68	9,12	7,43
8,00	1,93	2,01	2,62	8,68	
8,50	1,91	1,98	2,45	8,36	
9,00	1,9	1,92	2,32	8,11	
9,50	1,91	1,8	2,05	7,92	
10,00	1,9	1,9	1,98	7,88	
10,50	1,89	1,75	1,97	7,79	
11,00	1,88	1,77	1,88	7,68	
11,50	1,88	1,75			
12,00					

[0163] **Fig. 6** zeigt, dass die maximale Konzentration des Markers, die durch die Erfassungszone läuft, ansteigt, wenn die Menge des Markers in der Markerzone erhöht wird. Dies kann zu einem Anstieg der Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen führen. Darüber hinaus wird die Zeit, die der Komplex aus Analyt und Markerreagens zum Reagieren mit dem Erfassungsreagens hat, nicht verlängert.

[0164] **Fig. 7** zeigt, dass sowohl die maximale Konzentration des Markers, die durch die Erfassungszone läuft, als auch die Zeit, die erforderlich ist, um die Erfassungszone von Marker zu säubern, erhöht bzw. verlängert wird, wenn die Markermenge in der Markerzone erhöht wird. Dies würde längere Prüfzeiten zur Folge ha-

ben und die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen steigern.

[0165] [Fig. 8](#) zeigt die Intensitätskurve, in der der Gesamtmarker in der Hybridvorrichtung ungefähr gleich mit der Menge ist, die in dem Markerkissen der Vorrichtung enthalten ist, die einen hohen Markerprozentanteil nur in dem Markerkissen enthält, und ist außerdem ungefähr gleich mit der Markermenge, die in dem Markerkissen der Vorrichtung enthalten ist, die einen hohen Prozentanteil nur in der Markerzone enthält.

[0166] Ein Fachmann wird bereitwillig zu schätzen wissen, dass die vorliegende Erfindung wohl darauf eingerichtet ist, die Aufgaben auszuführen und die erwähnten als auch die darin inhärenten Ziele und Vorteile zu erzielen. Die immunologischen Verfahren und Vorrichtungen zum Nachweisen von Analyten in biologischen Proben sind gegenwärtig veranschaulichend für bevorzugte Ausführungsformen, sind beispielhaft und sind nicht als Einschränkungen des Schutzzumfangs der Erfindung gedacht. Änderungen daran und andere Anwendungen werden Fachmännern in den Sinn kommen, die vom Sinn der Erfindung umfasst sind oder durch diesen Schutzzumfang mit den Ansprüchen definiert werden.

[0167] Es wird einem Fachmann leicht ersichtlich sein, dass verschiedene Substitutionen und Modifikationen an der hierin offenbarten Erfindung vorgenommen werden können.

[0168] Alle in der Beschreibung erwähnten Patente und Veröffentlichungen sind ein Beispiel für die Fachkenntnisse der Fachmänner der Technik, die diese Erfindung betrifft.

Patentansprüche

1. Immunchromatographische Prüfvorrichtung zum Nachweis des Vorliegens oder Fehlens eines Analyten in einer flüssigen Probe, wobei die immunchromatographische Prüfvorrichtung Folgendes umfasst:

(a) einen Probenaufnahmebereich (**4**), der ein poröses Material umfasst, das den Lateralfluss einer flüssigen Probe leitet, in Lateralflusskontakt mit

(b) einem Analytnachweisbereich (**2**), der ein poröses Material umfasst, das den Lateralfluss der flüssigen Probe leitet, wobei der Analytnachweisbereich ein immobiles Indikatorerfassungsreagens an einem diskreten Indikatorerfassungsreagens-Ort (**2b**) umfasst,

wobei die immunchromatographische Vorrichtung außerdem Folgendes umfasst:

eine erste Indikatormarkierungsreagens-Zone (**2a**), die ein erstes mobiles Indikatormarkierungsreagens umfasst, und eine zweite Indikatormarkierungsreagens-Zone (**2a**), die ein zweites mobiles Indikatormarkierungsreagens umfasst, wobei die Lateralflusscharakteristika des Indikatormarkierungsreagens in der ersten Zone (**2a**) sich von den Lateralflusscharakteristika des Indikatormarkierungsreagens in der zweiten Zone (**2a**) unterscheiden und wobei die Zonen in Lateralflusskontakt mit dem Probenaufnahmebereich und dem Analytnachweisbereich stehen und wobei die flüssige Probe von dem Probenaufnahmebereich lateral in Richtung des Analytnachweisbereichs fließt und sich mit dem ersten und dem zweiten Indikatormarkierungsreagens vermischt, um das erste und das zweite Indikatormarkierungsreagens in Richtung des Analytnachweisbereichs (**2**) zu bewegen.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das erste Indikatormarkierungsreagens in der ersten Indikatormarkierungsreagens-Zone bei Lateralflusskontakt mit der Probe schnell mobilisiert wird und wobei Lateralflusskontakt der Probe mit dem zweiten Indikatormarkierungsreagens in der zweiten Markierungsreagens-Zone in einer retardierten Freisetzung des zweiten Indikatormarkierungsreagens resultiert.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das zweite Indikatormarkierungsreagens in der zweiten Indikatormarkierungsreagens-Zone bei Lateralflusskontakt mit der Probe schnell mobilisiert wird und wobei Lateralflusskontakt der Probe mit dem ersten Indikatormarkierungsreagens in der ersten Markierungsreagens-Zone in einer retardierten Freisetzung des ersten Indikatormarkierungsreagens resultiert.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das erste Indikatormarkierungsreagens sich in einem separaten Indikatormarkierungsreagens-Bereich befindet und wobei das zweite Indikatormarkierungsreagens sich in dem Analytnachweisbereich befindet.

5. Immunchromatographische Prüfvorrichtung zum Nachweis des Vorliegens oder Fehlens eines Analyten in einer flüssigen Probe, wobei die immunchromatographische Prüfvorrichtung Folgendes umfasst:

(a) einen separaten Probenaufnahmebereich (**4, 8**), der ein poröses Material umfasst, das den Lateralfluss einer flüssigen Probe leitet, wobei der Probenaufnahmebereich (**4, 8**) ein erstes mobiles Indikatormarkierungsreagens an einem diskreten Markierungsort (**8a**) umfasst, wobei das erste Indikatormarkierungsreagens einen

Komplex mit dem Analyten bilden kann, wobei der Probenaufnahmebereich in Lateralflysskontakt mit (b) einem separaten Analytnachweisbereich (7) steht, der ein poröses Material umfasst, das den Lateralflyss der flüssigen Probe leitet, wobei der separate Analytnachweisbereich (7) ein zweites mobiles Indikatormarkierungsreagens an einem diskreten Markierungsort, wobei das zweite mobile Indikatormarkierungsreagens einen Komplex bildet, der sich mit dem Analyten bindet, ein immobiles Indikatorerfassungsreagens an einem diskreten Erfassungsort umfasst, wobei das immobile Indikatorerfassungsreagens einen Komplex bildet, der den Analyten, das erste oder das zweite mobile Indikatormarkierungsreagens und das immobile Indikatorerfassungsreagens umfasst, wobei die Lateralflysscharakteristika des ersten mobilen Indikatormarkierungsreagens in dem Probenaufnahmebereich (4, 8) sich von den Lateralflysscharakteristika des zweiten mobilen Indikatormarkierungsreagens in dem Analytnachweisbereich (7) unterscheiden, wobei der Analytnachweisbereich in Lateralflysskontakt mit

(c) einem separaten Endflussbereich (5) steht, der ein poröses Material umfasst, das den Lateralflyss der flüssigen Probe leitet und überschüssige flüssige Probe absorbieren kann, wobei die flüssige Probe von dem Probenaufnahmebereich (4, 8) lateral in Richtung des Endflussbereichs (5) fließt und sich mit dem ersten und dem zweiten Indikatormarkierungsreagens und einem Kontrollmarkierungsreagens vermischt, um die Markierungsreagenzien in Richtung des Endflussbereichs zu bewegen

6. Immunchromatographische Prüfvorrichtung nach Anspruch 5, wobei der Probenaufnahmebereich weiterhin ein mobiles Kontrollmarkierungsreagens umfasst, und wobei der separate Analytnachweisbereich weiterhin ein immobiles Kontrollmarkierungsreagens an einem diskreten Kontrollort umfasst und das Kontrollmarkierungsreagens das Kontrollmarkierungsreagens binden kann und wobei die flüssige Probe sich weiterhin mit dem Kontrollmarkierungsreagens vermischt, um das Kontrollmarkierungsreagens in Richtung des Endflussbereichs zu bewegen.

7. Verfahren zum Ermitteln des Vorliegens oder Fehlens von Analyt in einer Probe, wobei das Verfahren das Aufbringen der Probe auf den Probenaufnahmebereich der Vorrichtung nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, um zu ermöglichen, dass die Probe durch den Analytnachweisbereich hindurch und in den Endflussbereich fließt, und das Nachweisen des Vorliegens oder Fehlens von Analyt in dem Analytnachweisbereich an dem diskreten Erfassungsreagens-Ort, der das Indikatorerfassungsreagens enthält, das den Komplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens binden kann, umfasst.

8. Verfahren zum Ermitteln des Vorliegens oder Fehlens von Analyt in einer Probe, wobei das Verfahren das Aufbringen der Probe auf den Probenaufnahmebereich der Vorrichtung nach Anspruch 1, 2, 3, 4 oder 6, um zu ermöglichen, dass die Probe durch den Analytnachweisbereich hindurch und in den Endflussbereich fließt, und das Nachweisen des Vorliegens oder Fehlens von Analyt in dem Analytnachweisbereich an dem diskreten Erfassungsreagens-Ort, der das Indikatorerfassungsreagens enthält, das den Komplex aus Analyt und Indikatormarkierungsreagens binden kann, und das Nachweisen des Vorliegens oder Fehlens eines positiven Kontrollsignals in dem Analytnachweisbereich an dem diskreten Kontrollort, der das Kontrollmarkierungsreagens enthält, das das Kontrollmarkierungsreagens binden kann, umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Analyt humanes Choriongonadotropin (hCG) ist.

10. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das erste Markierungsreagens ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist, der eine Immunreaktion mit dem β -Epitop von hCG zeigt und an blauen Latex konjugiert ist, und das zweite Markierungsreagens RSA ist, das an roten Latex konjugiert ist.

11. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Erfassungsreagens ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist, der eine Immunreaktion mit dem α -Epitop von hCG zeigt.

12. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Kontrollreagens ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist, der eine Immunreaktion mit dem RSA zeigt.

13. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Analyt Streptococcus der Gruppe A, ist.

14. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das erste Indikatormarkierungsreagens ein polyklonaler Antikörper ist, der eine Immunreaktion mit Streptococcus der Gruppe A zeigt und an Markierungsteilchen konjugiert ist.

15. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Erfassungsreagens ein polyklonaler Antikörper ist, der eine Immunreaktion mit Streptococcus der Gruppe A zeigt.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

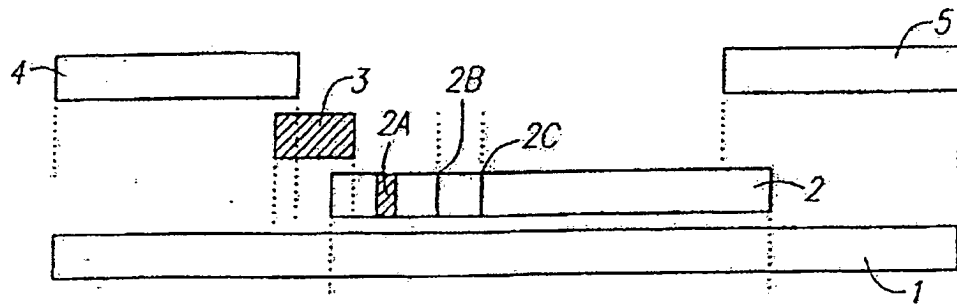


FIG. 1

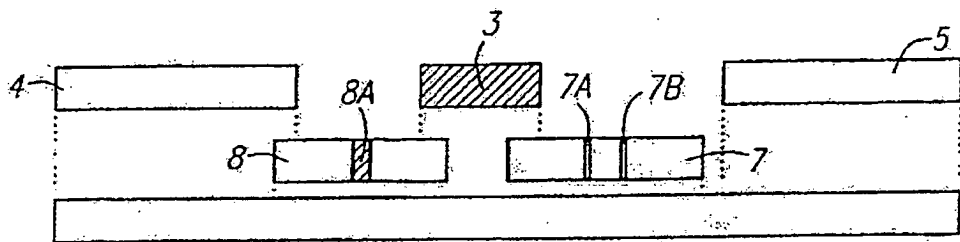


FIG. 2

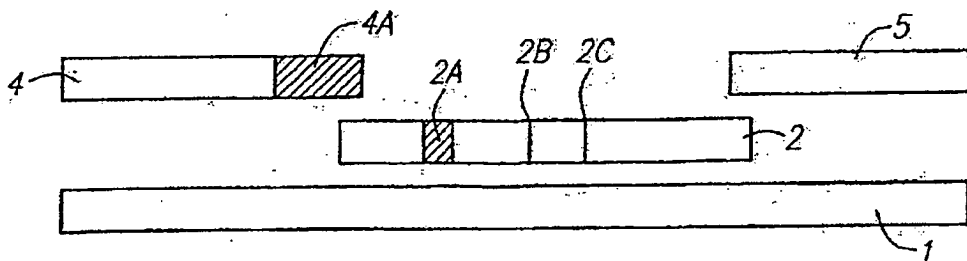


FIG. 3

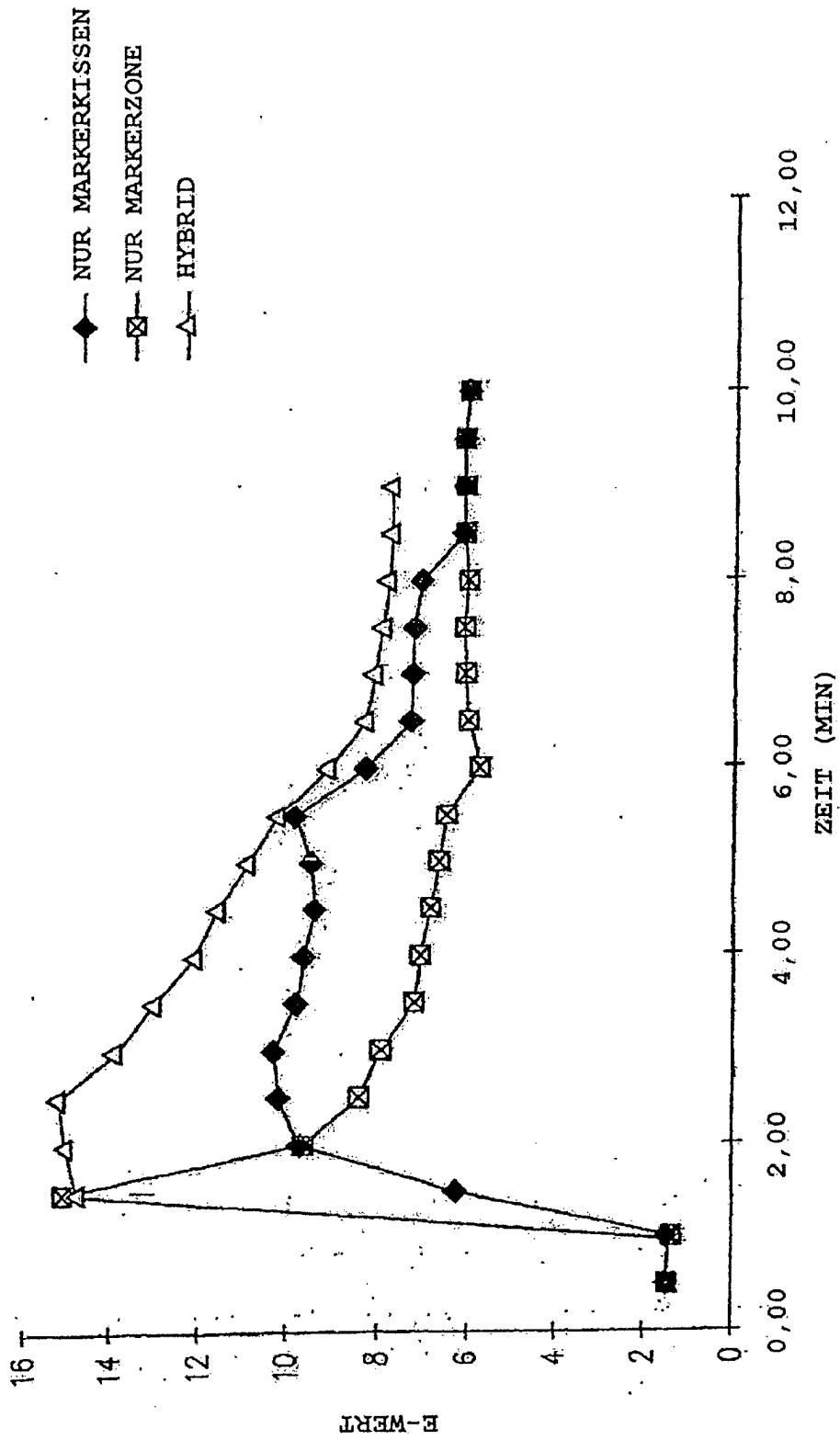


FIG. 4

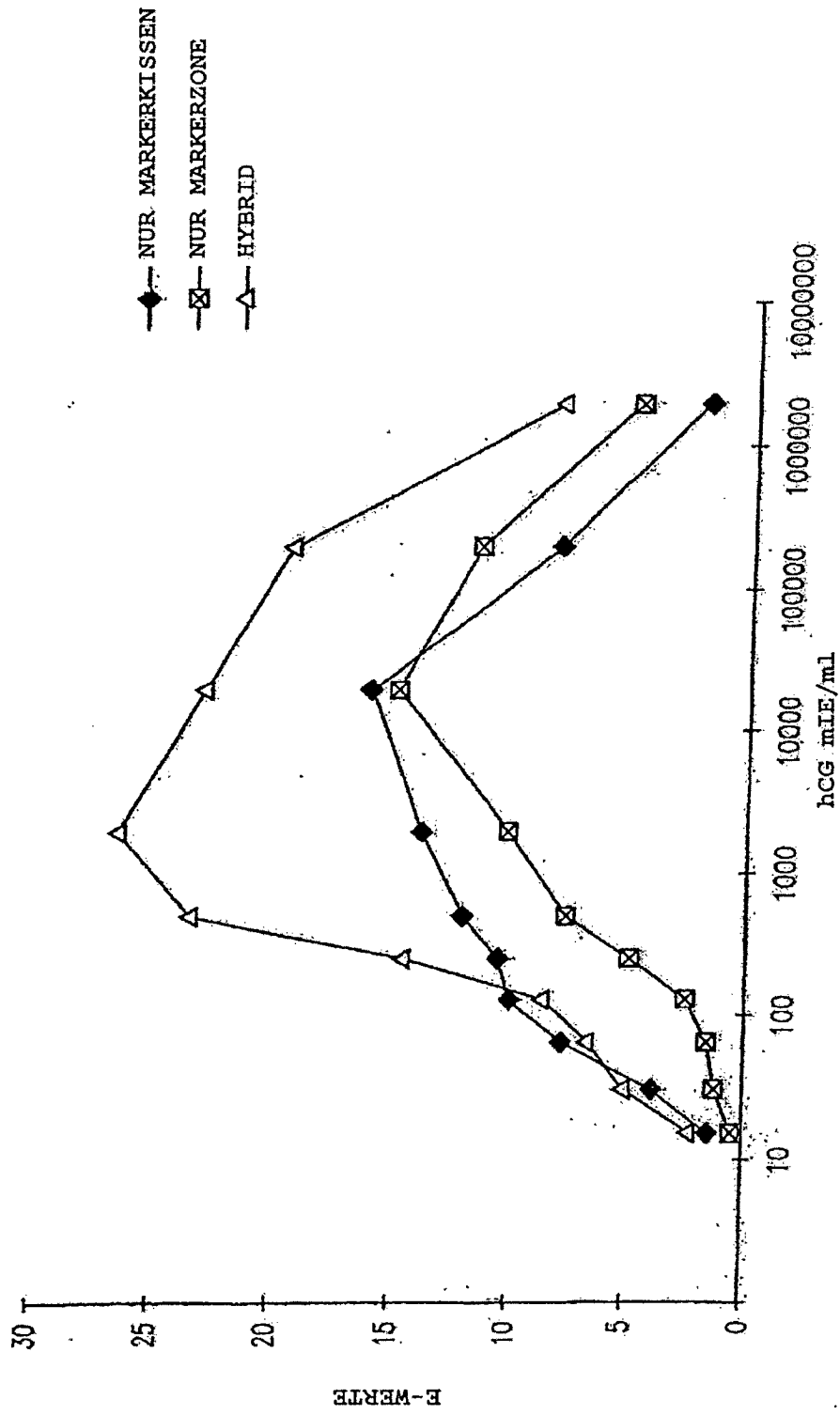


FIG. 5

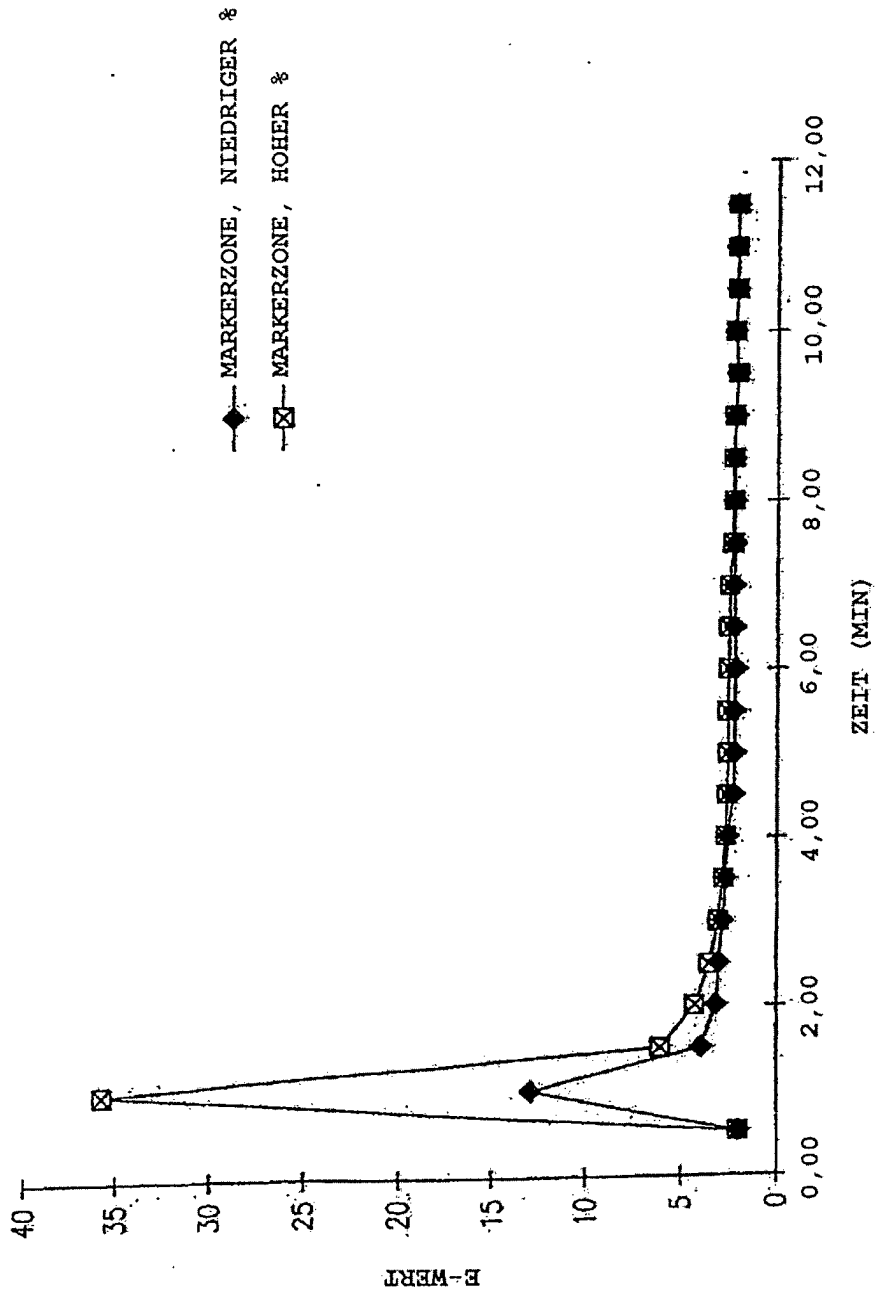


FIG. 6

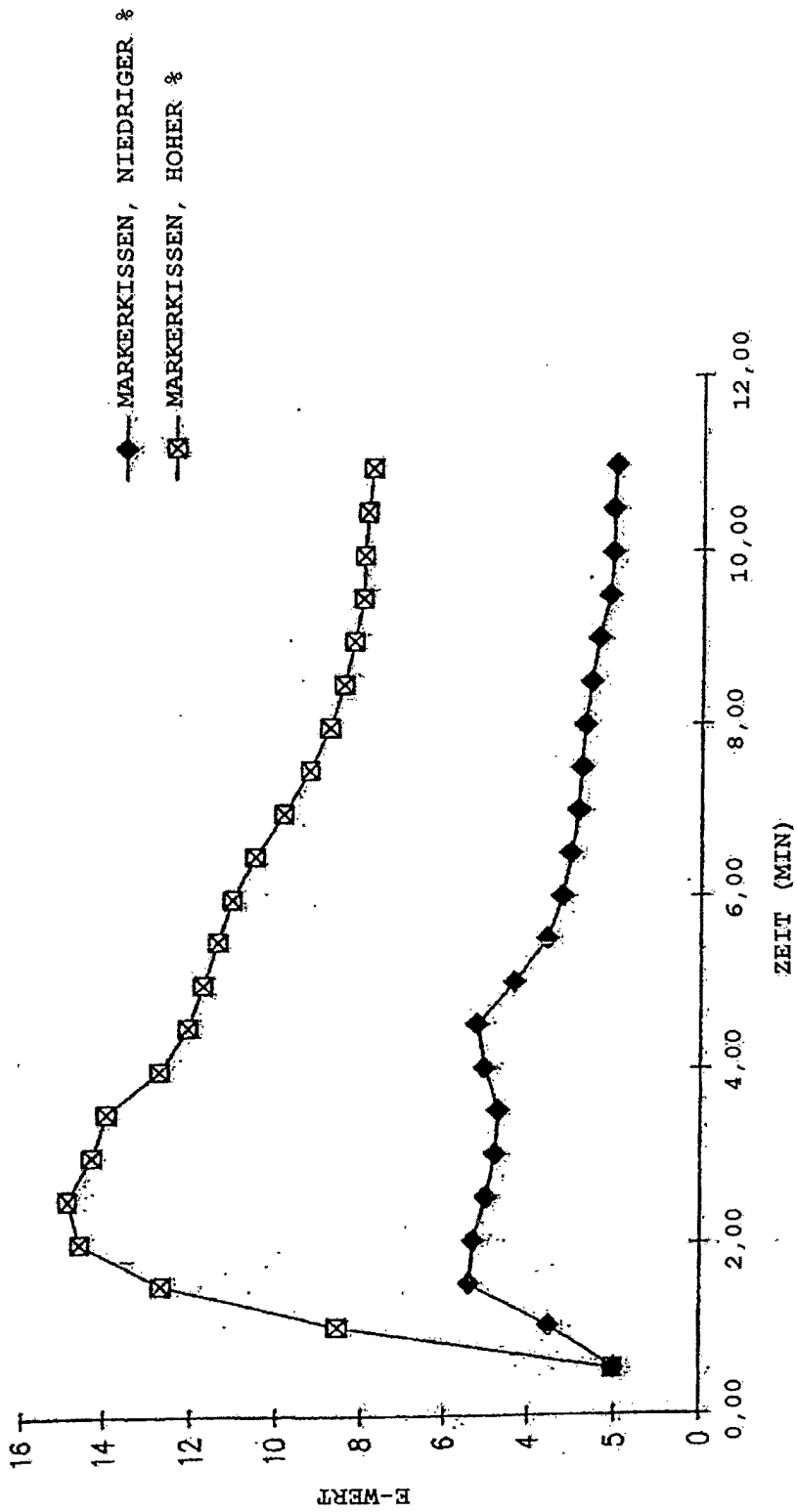


FIG. 7

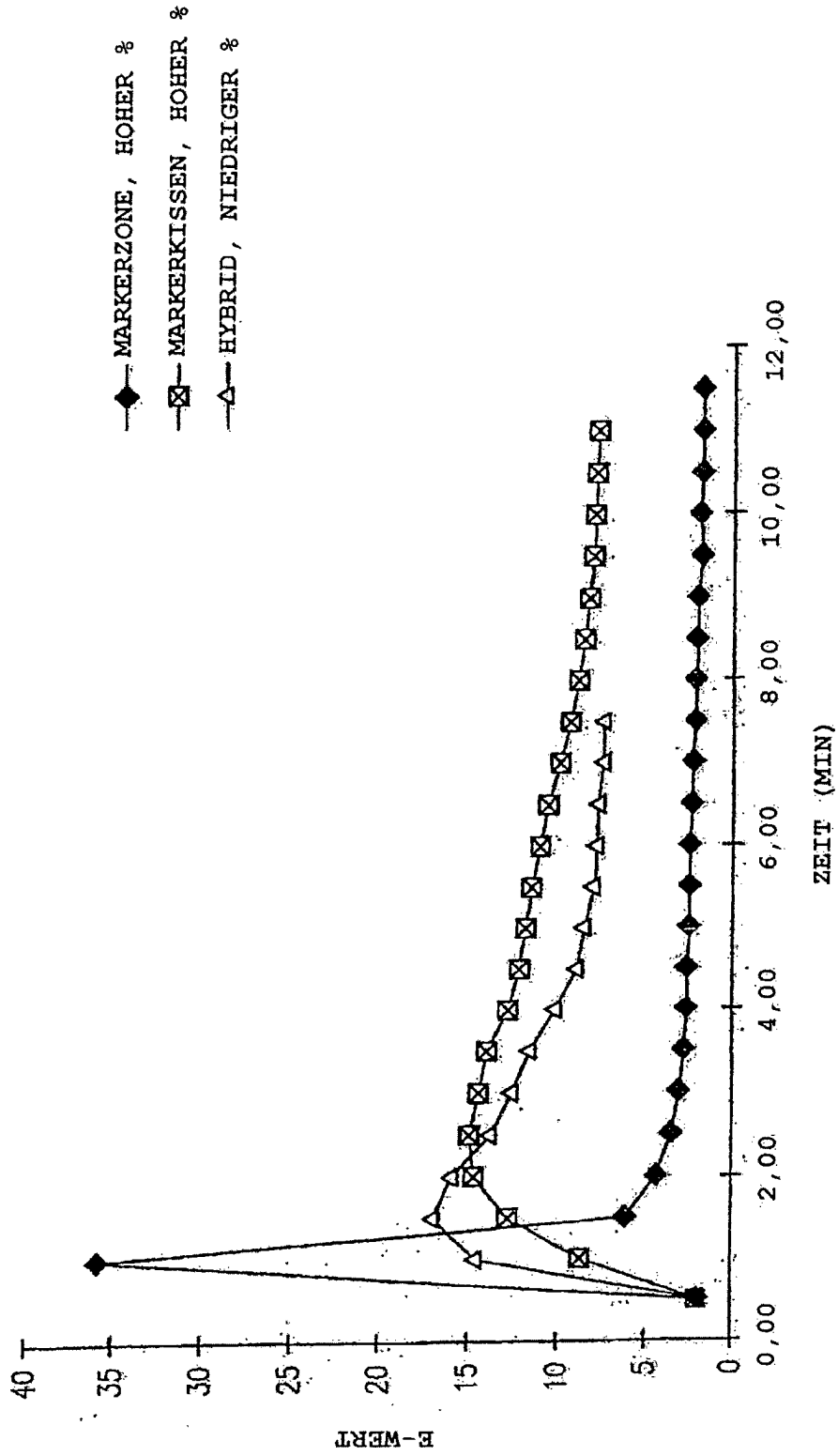


FIG. 8

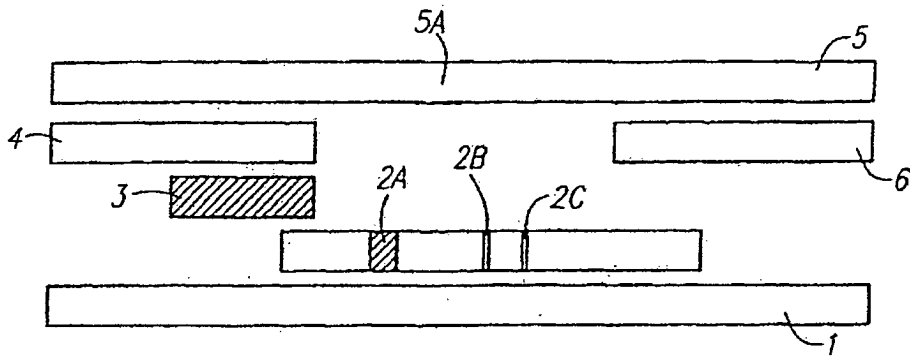


FIG. 9

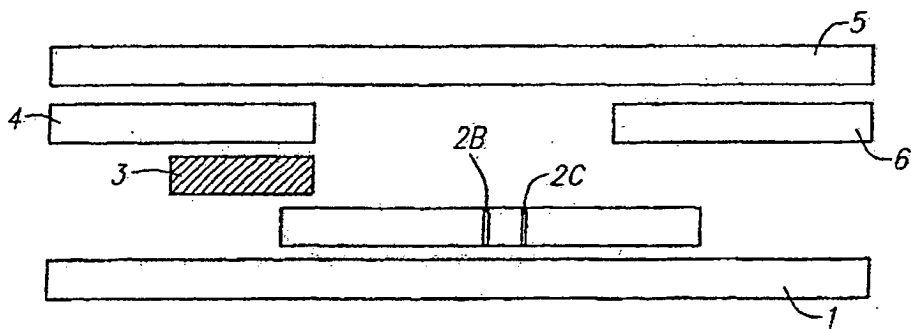


FIG. 10

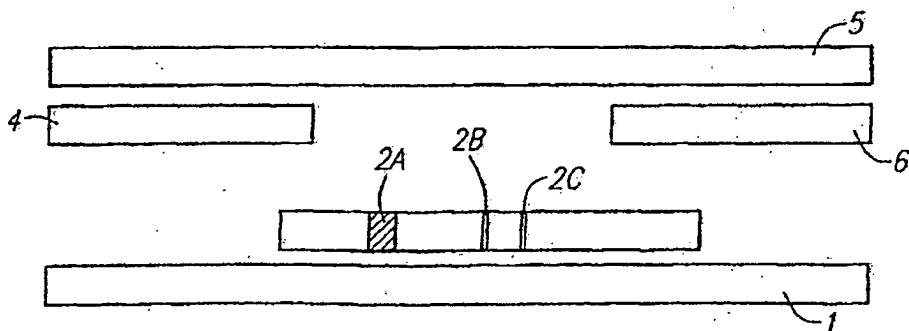


FIG. 11

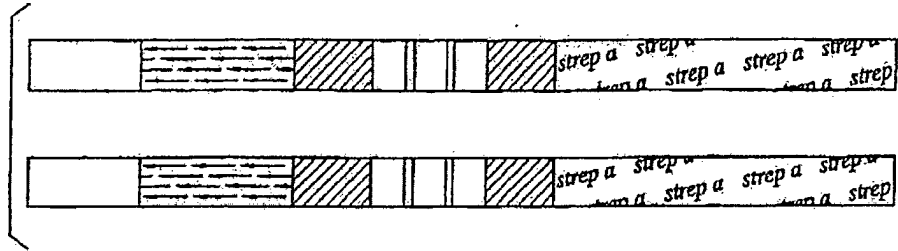


FIG. 16A

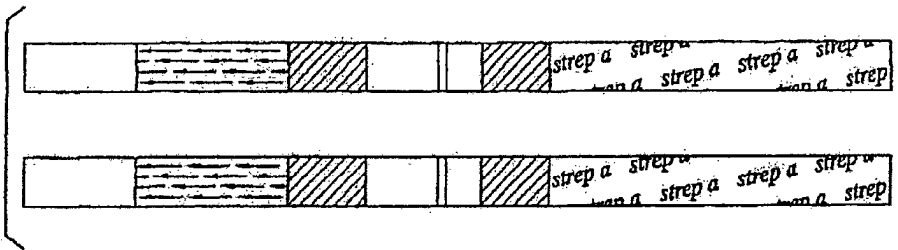


FIG. 16B

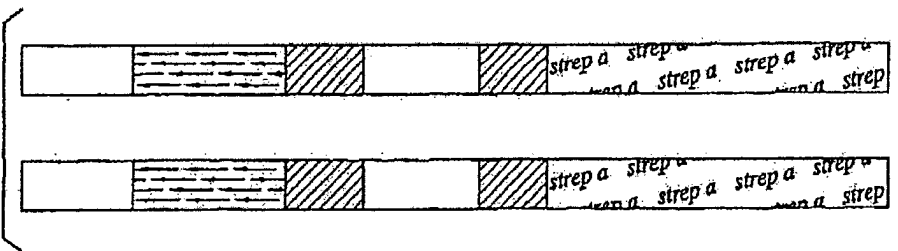


FIG. 16C