

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 000**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2014 PCT/JP2014/065243**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14199954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2014 E 14810458 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3009840**

54 Título: **Kit de diagnóstico inmunocromatográfico**

30 Prioridad:

10.06.2013 JP 2013121898

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

28.12.2018

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
1-105 Kanda Jinbocho, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

**HORII, ATSUSHI;
SHIOMI, YOSHIYUKI;
OGAWA, TAKAYUKI;
MATSUSE, TAKESHI y
SUGINO, MAKI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 695 000 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Kit de diagnóstico inmunocromatográfico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un kit de diagnóstico inmunocromatográfico que contiene una almohadilla de muestra para un reactivo de diagnóstico *in vitro*, y más específicamente se refiere a un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de flujo lateral.

10

Técnica anterior

En los últimos años, se han desarrollado reactivos de examen, reactivos de diagnóstico y kits de diagnóstico prácticos para llevar a cabo diversos exámenes para determinar la presencia de infección patógena por virus, bacterias o similares, la presencia o ausencia de embarazo, la presencia o ausencia de marcadores de cáncer y la presencia o ausencia de materias primas específicas o sustancias peligrosas tales como plaguicidas residuales en alimentos, en períodos de tiempo cortos. Estos utilizan reacciones específicas entre las diferentes sustancias que se van a examinar y sustancias que reaccionan específicamente con las sustancias que se van a examinar. En particular, se ha desarrollado una gran número de procedimientos de ensayo como inmunoensayos que usan una reacción antígeno-anticuerpo entre antígenos y anticuerpos, incluyendo ensayos inmunocromatográficos, inmunoensayos turbidimétricos, inmunoensayos enzimáticos, ensayos quimioluminiscentes, radioinmunoensayos, procedimientos de ensayo que usan resonancia de plasmón superficial, y similares. Estos procedimientos de ensayo también se utilizan para el examen de enfermedades en hospitales, clínicas y similares, y para el examen de alimentos en empresas alimentarias, por ejemplo. Entre estos, los ensayos inmunocromatográficos no requieren equipo, dispositivos o conocimiento especiales y su funcionamiento es práctico y económico, mientras que también permiten un diagnóstico rápido, y por lo tanto, se implementan comúnmente en una amplia gama de exámenes. En los últimos años, han llegado a venderse en farmacias habituales agentes de examen del embarazo, agentes de examen del VIH y similares, lo que permite la medición por los consumidores habituales, y también ha sido posible realizar no solo exámenes cualitativos para examinar la presencia o ausencia de sustancias que se van a examinar, sino también exámenes cuantitativos para la medición de sus cantidades.

El principio de medición en un ensayo inmunocromatográfico puede ser el del "procedimiento sándwich" o del "procedimiento competitivo". Además, el sistema de medición se puede basar en un procedimiento de flujo continuo o un procedimiento de flujo lateral. Es posible detectar una variedad de sustancias diferentes como sustancias que se van a examinar en un espécimen, y un ejemplo típico es la medición por detección de antígeno por el procedimiento de sándwich, en el que se lleva a cabo el siguiente procedimiento en orden.

(1) Se inmoviliza un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno como sustancia que se va a examinar en una sección prescrita de un medio cromatográfico tal como una membrana de nitrocelulosa, y se forma un sitio de reacción conocido como la "línea de prueba" (a continuación en el presente documento denominado "TL") en una localización deseada en el medio cromatográfico.

(2) Se prepara un reactivo de detección aplicando un anticuerpo que se une específicamente con la sustancia que se va a examinar, sobre una sustancia marcadora tal como una enzima, partículas cromógenas, partículas fluorescentes, partículas magnéticas o similares, y se recubre el reactivo de detección y se seca sobre un almohadilla de conjugado o similares, se forma una sección que contiene reactivo de detección, y esta se combina con el medio cromatográfico para formar un kit de diagnóstico inmunocromatográfico.

(3) Se deposita el espécimen real que contiene el antígeno, o una solución que lo contiene diluido con un líquido deseado, sobre la localización prescrita del kit de diagnóstico inmunocromatográfico, tal como en la misma almohadilla de muestra, y el antígeno y el reactivo de detección se extienden en el medio cromatográfico.

Usando esta serie de procedimientos, se captura la sustancia marcadora por medio del antígeno sobre el anticuerpo inmovilizado en el medio cromatográfico en el sitio de reacción, y se detecta la señal de la sustancia marcadora para su diagnóstico por el kit de diagnóstico inmunocromatográfico. Normalmente, el diagnóstico es un diagnóstico cualitativo que detecta solo la presencia o ausencia del antígeno, pero en los últimos años la intensidad de la señal se puede detectar visual o mecánicamente por diagnóstico cuantitativo.

60

Un tiempo de diagnóstico rápido es un requisito para un ensayo inmunocromatográfico. Esto es para acortar el tiempo de espera para el examen. Un procedimiento común para cumplir este requisito es un procedimiento de ajuste de los tamaños de poro del medio cromatográfico para incrementar la velocidad de desplazamiento del espécimen.

65

Además, la PTL 1 informa de que es posible un tiempo de diagnóstico más rápido usando una tela no tejida de fibra celulósica específica como almohadilla de muestra, en la sección donde se va a depositar la muestra de espécimen que contiene la sustancia que se va a examinar. La PTL 1 menciona la velocidad de absorción de líquido y la capacidad de extensión, pero no contiene datos concretos para el tiempo de diagnóstico y en ninguna parte se menciona una combinación con partículas cromógenas específicas, de acuerdo con la presente invención. Además, no menciona la modificación de la disposición de la almohadilla de muestra y la almohadilla de conjugado.

Además, la PTL 2 informa de que es posible lograr un tiempo de diagnóstico más rápido modificando la estructura del kit de diagnóstico y similares, pero la evaluación más corta en un ensayo de hCG, por ejemplo, es de 2 minutos y 35 segundos.

El incremento en la sensibilidad de análisis es otro requisito para un ensayo inmunocromatográfico. Esto quiere decir la capacidad de lograr la detección con una cantidad incluso menor de la sustancia que se va a examinar. En la PTL 3, los autores de la presente invención han informado de que se puede incrementar la sensibilidad de análisis usando partículas de celulosa que tienen un color denso y diámetros de partícula grandes como partículas cromógenas. Sin embargo, aunque se menciona que el diagnóstico rápido es posible usando partículas cromógenas que tienen un color denso y diámetros de partícula grandes, no existen datos concretos del tiempo de diagnóstico y no se menciona nada con respecto a la combinación con una almohadilla de muestra específica, de acuerdo con la presente invención.

Por tanto, en general existe una compensación entre la velocidad del tiempo de diagnóstico y el incremento en la sensibilidad de análisis, y existe una gran necesidad de lograr ambos simultáneamente.

Además, la PTL 4 divulga un procedimiento de prueba semicuantitativo usando inmunocromatografía, y establece que la concentración de antígeno y la intensidad de la señal del resultado del examen pueden ser proporcionales para las concentraciones de antígeno en determinados intervalos. Sin embargo, para la cuantificación en inmunocromatografía es ideal no solo tener una proporcionalidad entre la concentración de antígeno y la intensidad de la señal del resultado del examen a determinadas concentraciones de antígeno, sino también tener una reproducibilidad de los resultados de prueba, es decir, obtener una señal de la misma intensidad al medir el antígeno de la misma concentración, pero el consenso general es que dicha reproducibilidad todavía es inadecuada.

Además, la PTL 5 divulga un kit de diagnóstico inmunocromatográfico que usa partículas fluorescentes como partículas cromógenas, mencionando partículas de celulosa como ejemplo de material para las partículas cromógenas y una tela no tejida de celulosa como ejemplo de material para la almohadilla de muestra, pero ninguno se describe con detalle específico. Además, no menciona la modificación de la disposición de la almohadilla de muestra y la almohadilla de conjugado. Naturalmente, no se menciona nada con respecto a un efecto por combinación de la almohadilla de muestra y las partículas cromógenas, de acuerdo con la presente invención.

Lista de citas

Literatura de patente

[PTL 1] Publicación de patente no examinada japonesa n.º 2012-108031

[PTL 2] Publicación de patente no examinada japonesa HEI n.º 7-55809

[PTL 3] Publicación de patente internacional n.º WO2011/062157

[PTL 4] Publicación de patente internacional n.º WO2006/080438

[PTL 5] Publicación de patente internacional n.º WO2013/151066

El documento EP 2503337 divulga un kit inmunocromatográfico que comprende partículas orgánicas coloreadas que tienen un tamaño de grano promedio de 10 a 1000 nm. Las micropartículas coloreadas se fabrican de una mezcla de celulosa y tinte (10 %-870 % en peso de tinte, 20 %-90 % en peso de celulosa, intensidad de color entre 1,0-5,0).

El documento JP 2012/108031 divulga un dispositivo de prueba (kit) inmunocromatográfico que comprende y almohadillas de conjugado y de muestra superpuestas (factor de cobertura de aproximadamente un 50 %). La almohadilla de muestra se usa para el diagnóstico *in vitro* del tipo de flujo lateral. La almohadilla de muestra se fabrica de una tela no tejida de fibra continua de fibras de celulosa regenerada como componente principal (peso base 12-180 g/m², grosor 0,07 - 0,9 mm). En este dispositivo, se usa oro coloidal como partículas cromógenas.

Los documentos EP 2781918 y WO 2012/071145 divulgan dispositivos de prueba inmunocromatográficos de flujo lateral que comprenden almohadillas de conjugado y de muestra superpuestas (factor de cobertura de aproximadamente un 50 %). Se usa oro coloidal como partícula cromógena.

5 Divulgación de la invención

Problemas que debe resolver la invención

10 En vista de la técnica anterior mencionada anteriormente, el problema que debe resolver la presente invención es proporcionar un kit de diagnóstico inmunocromatográfico que permita un diagnóstico más rápido, tenga una sensibilidad de análisis alta y también tenga una reproducibilidad excelente de los resultados del examen.

Medios para resolver los problemas

15 Los autores de la presente invención han realizado una investigación minuciosa y mucha experimentación con el objetivo de resolver este problema, y como resultado han completado la presente invención al encontrar, de forma inesperada y sorprendente, que si se usan partículas con un color denso y un diámetro de partícula grande como partículas cromógenas y se usa una tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas específicas como almohadilla de muestra, usando estas en combinación, es posible incrementar la velocidad de diagnóstico
20 y la sensibilidad de análisis y también lograr una reproducibilidad excelente de los resultados del examen.

Específicamente, la presente invención es como sigue:

25 [1] Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico que incluye una almohadilla de conjugado que contiene un conjugado que incluye partículas cromógenas con un diámetro de partícula promedio de 100 a 1000 nm y una intensidad de color de 1,0 a 10,0, siendo el peso de partícula de un 10 a un 90 % en peso derivado de celulosa y de un 90 a un 10 % en peso derivado de un colorante, y una almohadilla de muestra para un reactivo de diagnóstico *in vitro* compuesto de una tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas,
30 con un peso base de 10 a 150 g/m² y un grosor de 0,07 a 1,00 mm,

en el que el factor de cobertura en la almohadilla de muestra para el reactivo de diagnóstico *in vitro* es de un 70 a un 100 % con respecto a la almohadilla de conjugado,

35 en el que se determina el factor de cobertura en base al área (A) en la sección donde se superponen la almohadilla de conjugado y la almohadilla de muestra y al área (B) de la almohadilla de conjugado completa que se determinan, y se realiza el cálculo por la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de cobertura (\%)} = \frac{\text{área (A) de la sección superpuesta}}{\text{área total (B)}} \times 100;$$

40 y se determina la intensidad de color de las partículas cromógenas usando un espectrofotómetro ultravioleta/visible/infrarrojo cercano JASCO V-650 de JASCO Corp. (sistema óptico: monocromador individual, montaje Czerny-Turner, sistema de doble haz, fuente de luz: lámpara de deuterio (190 a 350 nm), lámpara halógena (330 a 900 nm) con una unidad de esfera integradora montada ISV-722 por el mismo fabricante, siendo la muestra usada para la medición una dispersión acuosa de partículas cromógenas a una
45 concentración arbitraria, o partículas secas, ajustadas a una concentración de un 0,01 % en peso de partículas cromógenas y un 99,99 % en peso de agua purificada usando agua destilada como medio de dispersión, añadiendo la dispersión acuosa ajustada por concentración en una cantidad de 2,5 ml a una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria óptica de 10 mm (volumen: 3,5 ml, ancho de trayectoria óptica: 10 mm), y colocando la celda de cuarzo en el portamuestras del espectrofotómetro ultravioleta/visible/infrarrojo cercano, llevando a cabo la medición y el registro de los picos de absorbancia obtenidos, el máximo (ABS) en el intervalo de luz visible de 400 a 800 nm como la intensidad de color.

55 [2] Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con [1], en el que las fibras celulósicas regeneradas se componen principalmente por fibras de rayón cupramónico.

[3] Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con [1] o [2], en el que las fibras celulósicas regeneradas son filamentos continuos.

60 [4] Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en el que el número de pérdida de fibra de la tela no tejida compuesta de fibras celulósicas regeneradas es menor que 5000/m².

[5] Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en el que el colorante es un tinte reactivo.

65

Efecto de la invención

El kit de diagnóstico inmunocromatográfico de la invención incluye partículas cromógenas prescritas como sustancia marcadora, y emplea una tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas prescritas como la almohadilla de muestra, de este modo el diagnóstico es más rápido y se incrementa la sensibilidad de análisis, mientras que la reproducibilidad de los resultados del examen también es excelente.

La presente invención es una invención basada en el hallazgo por los autores de la presente invención de que combinando partículas cromógenas prescritas y una almohadilla de muestra prescrita, es posible lograr de forma inesperada y sorprendente un tiempo de diagnóstico más rápido, incrementar la sensibilidad de análisis e incrementar la reproducibilidad del examen. Como se divulga en la PTL 3, se ha demostrado que las partículas cromógenas con un diámetro de partícula grande y una intensidad de color alta tienen mayor sensibilidad de análisis incluso cuando se usan solas. Además, dicha sensibilidad de análisis alta también permite que el tiempo de diagnóstico se acorte en cierta medida. Sin embargo, debido a que un kit de diagnóstico inmunocromatográfico comprende diferentes estructuras porosas tales como el medio cromatográfico, las partículas cromógenas con diámetros de partícula grandes a veces encuentran interferencia con los poros de las estructuras porosas, inhibiendo su flujo. Cuando se han generado partículas que tienen flujo reducido, el tiempo de diagnóstico se puede retrasar potencialmente. Los autores de la presente invención consideraron que puede ser posible acortar adicionalmente el tiempo de diagnóstico permitiendo que las partículas cromógenas con diámetros de partícula grandes fluyan más fácilmente. Tras una investigación repetida basada en esta hipótesis, se descubrió que usando una tela no tejida hecha de fibras celulósicas regeneradas y que tiene una densidad aparente baja y un grosor pequeño como almohadilla de muestra, es posible incrementar el caudal por unidad de tiempo para el suministro a la almohadilla de conjugado que incluye las partículas cromógenas, y para facilitar el flujo de las partículas cromógenas en la almohadilla de conjugado, acortando de este modo el tiempo de diagnóstico. A veces se añaden agentes químicos tales como tensioactivos para facilitar el flujo de partículas cromógenas en almohadillas de muestra, y dado que la almohadilla de muestra de la presente invención absorbe al instante un espécimen depositado, permite que se proporcione constantemente una concentración fija de agente químico para facilitar el flujo de las partículas cromógenas en la almohadilla de conjugado o medio cromatográfico. Por tanto, las partículas cromógenas fluyen fácilmente sin encontrar interferencia en los poros de las estructuras porosas. En una almohadilla de muestra habitual, la concentración de agentes químicos que sirven para facilitar el flujo de las partículas cromógenas no es constante y se puede producir obstrucción de las partículas y similares, pero con los efectos mencionados anteriormente es posible permitir con éxito que todas las partículas cromógenas contribuyan en el examen, dando como resultado un incremento en la sensibilidad de análisis y también un incremento en la reproducibilidad del examen, mientras que también se descubrió que es posible aumentar estos efectos modificando adicionalmente la disposición de la almohadilla de muestra y la almohadilla de conjugado.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es una vista en sección transversal de un kit de diagnóstico inmunocromatográfico como un modo de realización de la invención.

La fig. 2 es una vista en sección transversal de un kit de diagnóstico inmunocromatográfico como un modo de realización de la invención, que muestra la sección posterior más alejada (h) de la almohadilla de muestra, donde el factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado es de un 100 %.

La fig. 3 es una vista en sección transversal de un kit de diagnóstico inmunocromatográfico como un modo de realización de la invención, que muestra la sección posterior más alejada (i) de la almohadilla de muestra, donde el factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado es de un 50 %.

La fig. 4 es una vista en sección transversal de un kit de diagnóstico inmunocromatográfico como un modo de realización de la invención, con el factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado al 100 %, y que muestra un estado donde se establece dentro de un recinto (j).

La fig. 5 es un gráfico que muestra la relación entre la intensidad de la señal de los resultados del examen (intensidad de color TL) para el examen de un espécimen positivo con concentración constante usando un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de la invención y su cambio en el tiempo (min).

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Los modos de realización de la invención se explicarán ahora en detalle.

El término "partículas cromógenas", para el propósito de la invención, se refiere a material particulado que es insoluble en agua, soluciones tamponadoras y similares, y soporta un pigmento, tinte o similares. El material que compone las partículas no está particularmente restringido, y los ejemplos de dichas partículas cromógenas incluyen partículas de coloides metálicos tales como coloide de oro, coloide de platino, coloide de plata, coloide de selenio y similares, partículas de látex coloreadas que incluyen látex a base de estireno coloreado tales como

látex de poliestireno, o látex a base de ácido acrílico, partículas de sílice coloreadas que son sílice coloreada con una estructura tridimensional hecha de átomos de silicio y átomos de oxígeno, partículas de celulosa coloreada que son celulosa coloreada y partículas cromógenas o partículas magnéticas que son partículas directas de un colorante como el negro de carbón. Las partículas cromógenas también pueden ser partículas fluorescentes. Las partículas de celulosa coloreadas son preferentes desde el punto de vista de la facilidad de ajuste de las características de las partículas, tales como ajuste del diámetro de partícula, ajuste de la intensidad de color, ajuste del tipo de color y ajuste del estado de la superficie de partícula. Debido a que la celulosa contiene numerosos grupos hidroxilo, tiene hidrofiliidad alta y estabilidad de dispersión excelente, y puede contener grandes cantidades de colorante.

No existen restricciones particulares sobre el "procedimiento para producir las partículas cromógenas". Se puede mencionar un procedimiento en el que en primer lugar se forman las partículas y a continuación un colorante tal como pigmento o tinte se aplica sobre ellas, un procedimiento en el que se forman partículas y partículas cromógenas más pequeñas de un pigmento o coloide metálico se aplican sobre ellas o un procedimiento en el que se añade un colorante tal como una sustancia colorante, tinte, pigmento, coloide metálico o similares y se forman conjuntamente con la formación de las partículas. Entre estos es preferente un procedimiento en el que en primer lugar se forman partículas y un colorante tal como un pigmento o tinte se aplica sobre ellas, desde el punto de vista de la facilidad de ajuste de las características de las partículas, incluyendo el ajuste del diámetro de partícula, ajuste de la intensidad de color, ajuste del tipo de color y ajuste de la condición de la superficie de la partícula. Es preferente un tinte como colorante aplicado, desde el punto de vista de aplicación más fácil.

Cuando se usa un tinte como colorante, el "tipo de tinte" no está particularmente restringido. Se pueden usar tintes tales como tintes reactivos, tintes directos, tintes auríferos, tintes ácidos, tintes básicos, tintes dispersos, tintes sulfurados, tintes vegetales, tintes naftol, tintes fluorescentes o similares. Por supuesto, se puede usar cualquier tinte deseado en combinación. Cuando se usa la celulosa como partículas, un tinte reactivo que se une a los grupos hidroxilo de la celulosa por enlace covalente es más preferente desde el punto de vista de permitir que se mantenga una gran cantidad de tinte y desde el punto de vista de la estabilidad.

Cuando en primer lugar se forman las partículas de celulosa y a continuación se aplica el colorante, el "procedimiento de formación de las partículas de celulosa" no está particularmente restringido. Se puede mencionar un procedimiento en el que se microniza físicamente celulosa natural usando un molino de bolas o un homogeneizador de alta presión, un procedimiento en el que se trata químicamente con un ácido o álcali para la micronización, o un procedimiento en el que se disuelve celulosa en un buen disolvente y se forman partículas. De forma alternativa, se puede disolver celulosa derivatizada y formar partículas, y reconvertir los sustituyentes derivatizados en grupos hidroxilo para preparar partículas de celulosa. Estos procedimientos de formación también se pueden combinar. El "tipo de celulosa" tampoco está particularmente restringido, y se pueden usar celulosa regenerada, celulosa refinada, celulosa natural, la celulosa derivatizada mencionada anteriormente o celulosa que tiene sustituyentes derivatizados reconvertidos en grupos hidroxilo. El procedimiento preferente entre estos es un procedimiento de disolución en un buen disolvente y formación de partículas, desde el punto de vista del ajuste del diámetro de partícula, ajuste de las conformaciones de partícula, etc., mientras que el tipo preferente de celulosa es celulosa regenerada.

Cuando se disuelve la celulosa en un buen disolvente y se forman partículas, el "tipo de buen disolvente que disuelve celulosa" no está particularmente restringido, y se pueden usar diversos disolventes buenos que pueden disolver celulosa, tales como solución de amoníaco de cobre, solución de viscosa, N-metilmorfolina, y diferentes líquidos iónicos y similares. La solución de amoníaco de cobre es preferente desde el punto de vista del ajuste del diámetro de partícula, ajuste de las conformaciones de partícula y similares. El procedimiento de formación de la celulosa disuelta en partículas tampoco está particularmente restringido. Se seleccionó un procedimiento de separación de fases para la presente invención.

El "diámetro de partícula promedio" de las partículas cromógenas es la mediana del diámetro promedio en volumen como se mide por el procedimiento de dispersión de luz dinámica, estando la mediana del diámetro promedio en volumen en el intervalo de 100 a 1000 nm. Si el diámetro de partícula promedio está dentro de este intervalo, el área de superficie de partícula será grande, de modo que la TL será más oscura, es decir, la sensibilidad de análisis será mayor, para su uso como kit de diagnóstico inmunocromatográfico. Si el diámetro de partícula promedio es demasiado pequeño, el área de superficie se reducirá y la sensibilidad de análisis puede disminuir o se puede producir una agregación de partículas. Desde este punto de vista, el diámetro de partícula es preferentemente 200 nm o mayor y más preferentemente 300 nm o mayor. Si el diámetro de partícula es demasiado grande, la obstrucción de los poros del medio cromatográfico tal como nitrocelulosa provocará coloración de las secciones que de otro modo serían blancas después del examen, produciendo un efecto adverso sobre el juicio de los resultados del examen y afectando a menudo al límite de detección. Desde este punto de vista, preferentemente el diámetro de partícula no es mayor que 800 nm y más preferentemente no es mayor que 600 nm. El diámetro de partícula promedio referido aquí es solo un valor promedio, y una porción de la distribución del tamaño de partícula puede estar fuera del intervalo.

El motivo para el uso del promedio en volumen para la evaluación del diámetro de partícula es que las partículas muy grandes en el kit de diagnóstico inmunocromatográfico obstruyen el medio cromatográfico, tal como nitrocelulosa, pero las partículas más grandes tienen un efecto mayor en base al promedio en volumen y, por lo tanto, se reflejará incluso el efecto de la presencia mínima de partículas grandes. Existen otros diversos procedimientos de expresión para evaluar el diámetro de partícula además del promedio en volumen, tal como el promedio en número y el promedio en área. Naturalmente, un procedimiento de expresión diferente dará un valor de diámetro de partícula diferente, pero se emplea el promedio en volumen para la presente invención.

El término "intensidad de color" es el valor que define la intensidad de color de las partículas. Como procedimiento para medir este valor, se prepara una dispersión de agua purificada de partículas cromógenas con concentración conocida y se somete a espectrofotometría visible usando una esfera integradora en un intervalo de 400 a 800 nm con una longitud de trayectoria óptica de 10 mm, se mide el valor máximo de la curva de absorbancia (ABS) obtenida, se divide el valor obtenido entre el porcentaje en peso de las partículas cromógenas, y se define el resultado como el valor en términos de absorbancia por 0,01 % en peso de partículas cromógenas. Por ejemplo, si la concentración de partículas cromógenas preparadas es de un 0,0045 % y el valor máximo de la curva de absorbancia es de 1,0, la intensidad de color es de $(1 \times 0,01) \div 0,0045 = 2,2$.

El motivo para realizar una espectrofotometría visible usando una esfera integradora para la medición de la intensidad de color de las partículas es permitir la medición más exacta de la intensidad de color de las partículas en un estado disperso en líquido. Otro procedimiento para medir la intensidad de color de las partículas es un procedimiento de medición de un sólido obtenido secando las partículas, usando un colorímetro o similares, pero la medición exacta de la intensidad de color de las partículas no es posible por dicho procedimiento. Por ejemplo, los coloides metálicos y similares difieren en su tono de color y longitud de onda máxima dependiendo del diámetro de partícula, y el estado agregado seco no puede reflejar con exactitud la intensidad de color presentada en un estado disperso en líquido. Además, se reduce la intensidad de color cuando se produce agregación en un líquido, incluso si la dispersión está a la misma concentración de partícula. Además, el motivo para el uso de una esfera integradora para la espectrofotometría visible es para eliminar el efecto de dispersión de las propias partículas. La espectrofotometría visible habitual es un procedimiento de medición de luz transmitida, y no solo reflejará la absorción de un haz incidente por el colorante sino también la influencia de la dispersión de las propias partículas. Por ejemplo, los coloides de oro usados comúnmente para inmunocromatografía tienen diámetros de partícula de 40 nm a 60 nm, y a veces hasta incluso 100 nm, y dado que estos son todos diámetros de partícula pequeños, no existe virtualmente ningún efecto sobre la luz dispersada. Por el contrario, las partículas de látex de poliestireno tienen diámetros de partícula grandes y claramente el efecto sobre la luz dispersada es considerable. Por este motivo, para reflejar con más exactitud la intensidad de color de las propias partículas cuando los diámetros de partícula o los materiales de partícula difieren, la presente invención emplea espectrofotometría visible usando una esfera integradora.

La "intensidad de color" de acuerdo con la invención es de 1,0 a 10,0. Si el valor es demasiado grande, la intensidad de color se vuelve más oscura y la sensibilidad de análisis se incrementa cuando se usa como kit de diagnóstico inmunocromatográfico. Por supuesto, es mejor un valor más grande, y se puede emplear un procedimiento tal como utilizar un tinte de color oscuro, incrementar el número de tinturas, unir a través de algún compuesto usado como espaciador, incrementar las regiones amorfas de las partículas para facilitar la infiltración del tinte, o crear porosidad en las partículas para facilitar la infiltración del tinte. Considerando la economía, sin embargo, el límite superior preferentemente no es mayor que 7,0 y más preferentemente no es mayor que 5,0. Además, dado que un valor más pequeño disminuye la sensibilidad de análisis para su uso como kit de diagnóstico inmunocromatográfico, el límite inferior es preferentemente 1,5 o mayor y más preferentemente 2,0 o mayor.

La "proporción del colorante en las partículas cromógenas" es la proporción de colorante del peso total de las partículas cromógenas. Por ejemplo, cuando 1,0 g de partículas cromógenas consiste en 0,2 g de celulosa y 0,8 g de colorante, la proporción de colorante es de un 80 % en peso. La proporción del colorante en las partículas cromógenas es preferentemente de un 10 a un 90 % en peso. Dentro de este intervalo, la sensibilidad de análisis será alta para su uso como kit de diagnóstico inmunocromatográfico. Además, cuando se usan partículas teñidas que son celulosa teñida como partículas cromógenas, manteniendo el tinte en este intervalo en la celulosa, permite que se imparta un grado adecuado de hidrofobicidad a la celulosa, y permite que las sustancias que se unen específicamente con objetivos de detección tales como anticuerpos se mantengan por adsorción. Naturalmente, en lugar de mantenerse por adsorción, es posible introducir grupos carboxilo o grupos amino en las partículas de celulosa coloreadas para permitir mantener las sustancias que se unen específicamente a los objetivos de detección por enlaces covalentes. Si la proporción del colorante es baja, no será posible obtener intensidad de color suficiente, y se reducirá la sensibilidad de análisis cuando se use como kit de diagnóstico inmunocromatográfico. Además, cuando se usan partículas que son celulosa y están teñidas con un tinte como partículas cromógenas, a veces es posible incluso incrementar las sustancias que se unen específicamente con el objetivo de detección incrementando la proporción de colorante. Desde este punto de vista, el límite inferior es preferentemente un 20 % en peso o mayor y más preferentemente un 30 % en peso o mayor. Aunque no existe un problema particular incluso si la proporción de colorante excede de un 90 % en peso, preferentemente no es mayor que un 85 % en peso y más preferentemente no es mayor que un 80 % en

peso, cuando se tienen en cuenta consideraciones económicas. Además, si la hidrofobicidad es demasiado fuerte, se puede producir agregación o reacciones inespecíficas.

5 El "procedimiento de cálculo de la proporción del colorante en las partículas cromógenas" se puede calcular a partir del cambio de peso antes y después de la coloración. Cuando el cálculo del cambio de peso es difícil, se puede llevar a cabo un procedimiento de separación del colorante de las partículas y aislar el colorante o las partículas para realizar el cálculo. Por ejemplo, cuando se han teñido las partículas de celulosa con un tinte reactivo, se pueden romper los enlaces covalentes entre la celulosa y el tinte con un ácido o álcali, y se recogen las partículas de celulosa por separación centrífuga para el cálculo. Además, se puede usar celulosa para la descomposición de la celulosa sola y se puede realizar el cálculo.

15 El "procedimiento de cálculo del componente derivado de celulosa de las partículas cromógenas" puede ser un cálculo de la proporción mencionada anteriormente del colorante en las partículas cromógenas. Específicamente, se puede realizar el cálculo por la fórmula: "proporción de componente derivado de celulosa de las partículas cromógenas" = 100 % - (proporción del colorante en las partículas cromógenas). La proporción del componente derivado de celulosa de las partículas cromógenas es preferentemente de un 90 a un 10 % en peso. Dentro de este intervalo, será posible mantener la estabilidad de dispersión para las partículas de celulosa. Además, por el mismo motivo mencionado para la proporción del colorante, el límite inferior para el componente derivado de celulosa de las partículas cromógenas es más preferentemente un 15 % en peso o mayor y lo más preferentemente un 20 % en peso o mayor, y el límite superior más preferentemente no es mayor que un 80 % en peso y lo más preferentemente no es mayor que un 70 % en peso.

25 El término "partículas" se refiere a estructuras que tienen longitudes similares para el diámetro largo (L) y el diámetro corto (D), y que tienen conformaciones casi esféricas. Específicamente, se refiere a estructuras que tienen una proporción L/D representada por $L \div D$ de 1,0 a 3,0. Si la proporción L/D está dentro de este intervalo, se inhibirá la obstrucción cuando se use como kit de diagnóstico inmunocromatográfico, siendo la proporción más preferentemente de 1,0 a 2,0, incluso más preferentemente de 1,0 a 1,5 y lo más preferentemente de 1,0 a 1,3. Como procedimiento de medición, se toma una imagen del microscopio electrónico de las partículas, se miden los diámetros largos (L) y los diámetros cortos (D) de 100 partículas, y se calcula el valor promedio para las 100 partículas.

35 El término "fibras celulósicas regeneradas" se refiere a fibras compuestas principalmente de celulosa regenerada. La celulosa regenerada puede ser cupra, lyocell, rayón o similares. Las fibras celulósicas regeneradas tienen una hidrofiliidad muy alta debido a la orientación y estado de las moléculas de superficie durante la formación de las fibras, así como propiedades de absorción de líquido excelentes, y por lo tanto son preferentes como material para componer la almohadilla de muestra, siendo cupra y lyocell más preferentes y siendo cupra el más preferente. Puede estar compuesto de un 100 % de fibras celulósicas regeneradas específicas, o se pueden usar en mezcla.

40 La expresión "tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas" se refiere a una tela no tejida fabricada de las fibras celulósicas regeneradas mencionadas anteriormente. La estructura se puede formar fácilmente con una tela no tejida, y el manejo también es excelente, permitiendo el enrollamiento en un rollo o similares. El tipo de tela no tejida puede ser una tela no tejida de fibras cortadas o una tela no tejida de filamentos largos, pero es preferente una tela no tejida de filamentos continuos por sus propiedades de absorción de agua excelentes y baja pérdida de fibras. Además, para el control de la estabilidad de forma y la velocidad de absorción de líquido, se pueden mezclar fibras sintéticas con un intervalo que no afecte a la hidrofiliidad, caso en el que el contenido de las fibras celulósicas regeneradas es preferentemente al menos de un 50 % en peso de la proporción de área. Las fibras sintéticas no están particularmente restringidas siempre que satisfagan las propiedades físicas deseadas de la almohadilla de muestra, y pueden ser, por ejemplo, fibras sintéticas basadas en poliolefina, basadas en poliéster, basadas en poliamida o basadas en acrílico, de las que se pueden usar una cualquiera o más. Estas también se pueden usar con un aglutinante si es necesario, o se pueden someter a un tratamiento de enredo o similares.

55 El "peso base de la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas" es de 10 a 150 g/m². El peso base puede variar apropiadamente dependiendo del tamaño de la almohadilla de muestra, el volumen de líquido del espécimen, el tipo de examen, etc., pero si el peso base está dentro del intervalo mencionado anteriormente, se obtendrá un equilibrio satisfactorio para la absorción del fluido del espécimen y desarrollo en la almohadilla de conjugado, y después de que el espécimen se haya absorbido rápidamente, será posible suministrar rápidamente el espécimen a la almohadilla de conjugado. Una tela no tejida con un peso base excesivamente bajo tendrá un grosor pequeño o un alto porcentaje de vacío, y una mala migración de fluido del espécimen en la almohadilla de muestra y capacidad de extensión en la almohadilla de conjugado. Desde este punto de vista, el límite inferior para el peso base es preferentemente 15 g/m² o mayor, más preferentemente 20 g/m² o mayor y lo más preferentemente 25 g/m² o mayor. Además, una tela no tejida con un peso base excesivamente alto tendrá un grosor grande o un bajo porcentaje de vacío, y el fluido del espécimen no podrá penetrar fácilmente en la almohadilla de muestra, provocando que el fluido se deslice sobre la almohadilla de muestra. Desde este punto

de vista, el límite superior para el peso base preferentemente no es mayor que 120 g/m^2 y más preferentemente no es mayor que 100 g/m^2 .

El "grosor de la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas" es de 0,07 a 1,00 mm. El peso base puede variar apropiadamente dependiendo del tamaño de la almohadilla de muestra, el volumen de líquido del espécimen, el tipo de examen, etc., pero si el grosor está dentro del intervalo mencionado anteriormente, se obtendrá un equilibrio satisfactorio para la absorción del fluido del espécimen y desarrollo en la almohadilla de conjugado, y después de que el espécimen se haya absorbido rápidamente, será posible suministrar rápidamente el espécimen a la almohadilla de conjugado. Si el grosor es demasiado pequeño, no será posible recibir adecuadamente el fluido del espécimen. El manejo del kit de diagnóstico también será más difícil durante las etapas de producción. Desde este punto de vista, el límite inferior para el grosor es preferentemente de 0,10 mm y más preferentemente de 0,20 mm. Además, si el grosor es demasiado grande, se mantendrá demasiado fluido del espécimen, lo que es indeseable. Desde este punto de vista, el límite superior para el grosor preferentemente no es mayor que 0,80 mm y más preferentemente no es mayor que 0,70 mm.

La "densidad aparente de la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas" es preferentemente de $0,06$ a $1,00 \text{ g/cm}^3$. La densidad aparente puede variar apropiadamente dependiendo del tamaño de la almohadilla de muestra, el volumen de líquido del espécimen, el tipo de examen, etc., pero si la densidad aparente está dentro del intervalo mencionado anteriormente, se obtendrá un equilibrio satisfactorio para la absorción del fluido del espécimen y desarrollo en la almohadilla de conjugado, y después de que el espécimen se haya absorbido rápidamente, será posible suministrar rápidamente el espécimen a la almohadilla de conjugado. Si la densidad aparente es demasiado baja, se incrementarán los vacíos en las fibras, dando lugar a una mala migración de fluido del espécimen en la almohadilla de muestra y capacidad de extensión en la almohadilla de conjugado. Desde este punto de vista, el límite inferior para la densidad aparente es preferentemente $0,07 \text{ g/cm}^3$ y más preferentemente $0,10 \text{ g/cm}^3$. Además, si la densidad aparente es demasiado alta, las fibras se volverán demasiado compactas y el fluido del espécimen no podrá penetrar fácilmente en la almohadilla de la muestra, provocando que el fluido se deslice sobre la almohadilla de la muestra. Desde este punto de vista, el límite superior para la densidad aparente preferentemente no es mayor que $0,70 \text{ g/cm}^3$ y más preferentemente no es mayor que $0,50 \text{ g/cm}^3$.

El "número de pérdida de fibras" es el número de fibras con tamaños de $100 \mu\text{m}$ o mayores que se pierden por unidad de metro cuadrado cuando se dispone una muestra de $25 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ en 300 ml de agua purificada y se deja reposar durante 2 minutos, y a continuación se retira la muestra y se filtra el fluido restante con papel de filtro negro (ADVANTEC NO131), el papel de filtro después de filtrar se fija en una cámara termostática ($20 \text{ }^\circ\text{C}$, 65% de HR) durante 12 horas y se seca y se determina el recuento usando un videomicroscopio. De acuerdo con la invención, el número de pérdida de fibras es preferentemente menor que $5.000/\text{m}^2$, más preferentemente menor que $4.000/\text{m}^2$, y aún más preferentemente menor que $3.000/\text{m}^2$. Si el número de pérdida de fibras es mayor que $10.000/\text{m}^2$, esto no es deseable ya las fibras se caerán fácilmente, y dependiendo del tipo de fluido de examen, las fibras desprendidas se acumularán en la interfaz entre la almohadilla de muestra y la almohadilla de conjugado, afectando a la capacidad de desarrollo y también contaminando el área alrededor de la línea de producción durante la producción, tendiendo a dar como resultado un mal rendimiento. Puesto que es preferente un número de pérdida de fibras inferior, el límite inferior es tan bajo como $1/\text{m}^2$.

Como se muestra en la fig. 1(a), la "almohadilla de muestra" de acuerdo con la invención es la sección que primero recibe un espécimen que se va a medir por inmunocromatografía. Las almohadillas de muestra comunes incluyen papel de filtro de celulosa, papel, fibras de vidrio, fibras de vidrio, fibras acrílicas, fibras de nylon y diversas telas tejidas, pero para la invención la almohadilla de muestra usada es una tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas, como se menciona anteriormente. La tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas tiene propiedades de absorción de líquido excelentes y, por lo tanto, el espécimen se absorbe rápidamente y el espécimen puede migrar a la almohadilla de conjugado. Además, si la estructura de la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas es la estructura descrita anteriormente, es posible incrementar el caudal por unidad de tiempo para el suministro a la almohadilla de conjugado, y facilitar mejor la liberación inicial de las partículas cromógenas en la almohadilla de conjugado, acortando de este modo el tiempo de diagnóstico. Además, se puede suministrar un agente químico para facilitar el flujo de las partículas cromógenas a una concentración fija constante, para permitir un flujo más fácil sin obstrucción de las partículas cromógenas. Puesto que, como resultado de esto, casi todas las partículas pueden contribuir al examen, se incrementa la sensibilidad de análisis y también se puede mejorar la reproducibilidad del examen. Por el contrario, cuando las partículas cromógenas en la almohadilla de conjugado no se liberan inicialmente, el tiempo de diagnóstico se alarga. Además, cuando no se liberan virtualmente todas las partículas cromógenas de la almohadilla de conjugado, se reduce la sensibilidad de análisis y la reproducibilidad del examen es mala.

De acuerdo con la invención, la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas puede contener diferentes polvos o agentes químicos, o se puede derivatizar una porción de la celulosa, para controlar la hidrofiliidad/repelencia al agua de la almohadilla de muestra o el factor de absorción de agua, siempre que las propiedades físicas mencionadas anteriormente no se vean afectadas negativamente y que la reacción antígeno-anticuerpo y la estabilidad del anticuerpo no se vean afectadas. Los ejemplos de agentes químicos que se van a

impregnar incluyen tensioactivos, proteínas, anticuerpos, resinas, polímeros solubles en agua, agentes antimicrobianos, agentes antisépticos, antioxidantes y similares. Además, los ejemplos de formas de celulosa derivatizada incluyen formas carboximetiladas, carboxietiladas, con aminas primarias, con aminas secundarias, con aminas terciarias, con aminas cuaternarias e hidroxiladas.

5 De acuerdo con la invención, la almohadilla de muestra se puede someter a pretratamiento si es necesario. Por ejemplo, se puede someter a tratamiento para la adición previa de una solución tamponadora, un tensioactivo, una proteína, un reactivo para atrapar contaminantes en la muestra de espécimen, un agente antiséptico, un agente antimicrobiano, un antioxidante, un humectante o similares. Además, no existe una restricción particular sobre la forma de la almohadilla de muestra, y por ejemplo, el tamaño de la almohadilla de muestra es tal que la longitud (longitud fluida por el fluido) es preferentemente de aproximadamente 10 a 25 mm considerando la propiedad de asociación del fluido de espécimen, y el tiempo de diagnóstico, mientras que no hay problema si el ancho (perpendicular al flujo del fluido) es más grande que el ancho de la almohadilla de conjugado. Si el ancho es demasiado estrecho, el fluido de examen se puede filtrar potencialmente alrededor de los bordes de la almohadilla de muestra.

El "kit de diagnóstico inmunocromatográfico" de la presente invención detecta de forma práctica la presencia o ausencia de una sustancia que se va a examinar en diversos especímenes. El tipo de kit de diagnóstico puede ser un sistema de flujo lateral o un sistema de flujo continuo. No está particularmente restringido siempre que use partículas cromógenas y una almohadilla de muestra, pero preferentemente es un sistema de flujo lateral. Los sistemas de flujo lateral incluyen tipos de varillas medidoras y tipos de casetes, y no existe una restricción particular sobre el tipo. La construcción del kit de diagnóstico no está particularmente restringida, y puede ser cualquier construcción comúnmente empleada en el campo. Los tipos de miembros distintos de la almohadilla de conjugado (b) que contienen las partículas cromógenas sensibilizadas con anticuerpos y la almohadilla de muestra (a) no están particularmente restringidos siempre que sean los que se empleen en el campo y, por ejemplo, se pueden mencionar (e) un medio cromatográfico, (f) una almohadilla absorbente y (g) una placa de montaje, como se muestra en la fig. 1. Algunos de estos miembros se pueden omitir si es necesario. Un ejemplo para la estructura es la estructura mostrada en la fig. 1 de la PTL 1. La fig. 1 adjunta a la presente memoria descriptiva es meramente un ejemplo y no impone limitaciones en absoluto a la presente invención.

La "almohadilla de conjugado" es una almohadilla que contiene un conjugado que incluye partículas cromógenas y, por ejemplo, puede contener partículas cromógenas unidas a un anticuerpo que se une a la sustancia que se va a examinar. No existen restricciones particulares sobre el material de la almohadilla de conjugado, y se pueden usar fibras de vidrio comunes, fibras de resina o similares. Se pueden usar adecuadamente fibras de resina incluyendo fibras de resina que están basadas en polietileno u otras poliolefinas, o basadas en poliéster, basadas en poliamidas, acrílicas o similares, así como fibras compuestas de estas fibras de resina, sin que haya ninguna limitación a estas. Las fibras de resina son preferentes desde el punto de vista del entorno de trabajo. Entre las fibras de resina, los materiales con un cierto grado de hidrofobicidad son más preferentes desde el punto de vista de liberación más fácil de las partículas cromógenas. Si la hidrofobicidad es demasiado alta, se puede usar un pretratamiento con un tensioactivo o similares. Más preferente es una almohadilla de conjugado de fibra de polietileno que se ha pretratada con un tensioactivo.

De acuerdo con la invención, el factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado es preferentemente de un 70 a un 100 %. El factor de cobertura referido aquí es la proporción de cobertura por la almohadilla de muestra con respecto al área superior de la almohadilla de conjugado. Por ejemplo, el valor es de un 0 % cuando absolutamente nada de la almohadilla de muestra se superpone con la parte superior de la almohadilla de conjugado, y de un 100 % cuando la cubre completamente. Para el procedimiento de cálculo, se determinan el área (A) en la sección donde se superponen la almohadilla de conjugado y la almohadilla de muestra y el área (B) de la almohadilla de conjugado completa, y se realiza el cálculo por la siguiente fórmula.

$$\text{Factor de cobertura (\%)} = \frac{\text{área (A) de la sección superpuesta}}{\text{área total (B)}} \times 100$$

En un kit de diagnóstico inmunocromatográfico común, el factor de cobertura normalmente no es mayor de un 50 %. Por ejemplo, en la PTL 1, la porción superpuesta de la almohadilla de muestra es de 5 mm en comparación con 15 mm como la longitud de la almohadilla de conjugado y, por lo tanto, el factor de cobertura es de un 33 %. En la PTL 5, el factor de cobertura es de un 0 %. En un kit de diagnóstico inmunocromatográfico común, el espécimen suministrado a la almohadilla de muestra migra a la almohadilla de conjugado, y a continuación migra adicionalmente al medio cromatográfico. Si el factor de cobertura es bajo en este momento, el espécimen migrará al medio cromatográfico sin que el espécimen se suministre suficientemente al extremo posterior de la almohadilla de conjugado en la sección que no está en contacto con la almohadilla de muestra, y como resultado, cuando las partículas cromógenas tienen diámetros de partícula grandes de acuerdo con la presente invención, la liberación desde la almohadilla de conjugado se puede ralentizar. Por tanto, de acuerdo con la invención, el factor de cobertura es de un 70 % a un 100 %, de modo que el espécimen se suministra rápidamente incluso al extremo posterior de la almohadilla de conjugado, y la liberación de las partículas cromógenas puede ser más rápida. Para mejorar la propiedad de liberación, el límite inferior preferente para el factor de cobertura es de un 60 %, más preferentemente de un 70 %, incluso preferentemente de un 80 % y más preferentemente de un 90 %.

Por otro lado, cuando se ha incrementado el factor de cobertura de la almohadilla de muestra con respecto a la almohadilla de conjugado de acuerdo con la presente invención, se puede elevar el extremo posterior de la almohadilla de muestra de la almohadilla de conjugado, dependiendo de la construcción del kit de diagnóstico inmunocromatográfico. Esto se produce cuando la almohadilla de muestra que se adhiere a la placa de montaje no puede seguir la conformación de la almohadilla de conjugado y se curva hacia arriba. Para resolver este problema, es preferente una estructura en la que se reduce la sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra. El procedimiento reductor puede ser un procedimiento para disponer el kit de inmunocromatografía en una envoltura y reducir la porción en la sección de envoltura, o un procedimiento de uso de una lámina transparente provista con una superficie de unión. El grado óptimo de reducción dependerá de la construcción del kit de diagnóstico inmunocromatográfico y, por lo tanto, no se puede especificar para todos los casos, pero como intervalo general, por ejemplo, la sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra preferentemente se ajusta para que sea de -5 a + 2 mm con respecto al grosor total del miembro de kit de diagnóstico inmunocromatográfico. La sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra tendrá una localización diferente dependiendo del factor de cobertura de la almohadilla de muestra. Por ejemplo, la sección posterior más alejada (h) en el caso de un factor de cobertura de un 100 % se muestra en la fig. 2, y la sección posterior más alejada (i) en el caso de un factor de cobertura de un 50 % se muestra en la fig. 3. La fig. 2 y fig. 3 son meramente ejemplos y no imponen limitaciones en absoluto a la presente invención. Además, el grosor total del miembro de kit de diagnóstico inmunocromatográfico, en la sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra en la fig. 2, por ejemplo, donde la almohadilla de muestra, la almohadilla de conjugado, el medio cromatográfico y la placa de montaje se superponen, es la suma del grosor de estos miembros. Si el grosor total en la sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra excede +2 mm del grosor total del miembro de kit de diagnóstico inmunocromatográfico, la almohadilla de muestra se puede elevar de la almohadilla de conjugado y las partículas de celulosa coloreadas en la almohadilla de conjugado puede que no se liberen adecuadamente, y por lo tanto preferentemente no es mayor que el grosor total +1 mm, y más preferentemente no es mayor que el grosor total +0 mm. Por otra parte, si el grosor total de la sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra es menor que -5 mm con respecto al grosor total del miembro de kit de diagnóstico inmunocromatográfico, la almohadilla de conjugado o el medio cromatográfico se pueden comprimir demasiado, provocando potencialmente obstrucción durante el desarrollo de las partículas cromógenas, y por lo tanto preferentemente no es menor que -3 mm y más preferentemente no es menor que -1 mm con respecto al grosor total de los miembros. La fig. 4 muestra el ajuste del grosor usando una envoltura (j). En general, una envoltura consiste en una parte superior y una parte inferior, y el ajuste de su espacio libre permite que se ajuste el grosor. La fig. 4 es meramente un ejemplo y no impone limitaciones en absoluto a la presente invención.

El "procedimiento de diagnóstico" que usa el kit de diagnóstico inmunocromatográfico de la invención se refiere a diversas maneras de diagnóstico llevadas a cabo usando kits de diagnóstico inmunocromatográfico. El objetivo del diagnóstico no está particularmente restringido, y el kit se puede usar para el examen de diversos objetivos de diagnóstico, incluyendo el examen de seres humanos, animales, alimentos o plantas o seguimiento ambiental. En un procedimiento de diagnóstico común, se extrae una muestra de espécimen del objetivo de examen, se somete a pretratamiento tal como extracción y filtración si es necesario, y se deposita sobre la almohadilla de muestra, se deja transcurrir un tiempo prescrito desde el inicio del examen, y se juzgan los resultados del diagnóstico en base a la diferencia de color producida por la presencia o ausencia de la sustancia que se va a examinar. Naturalmente, no existe ninguna limitación para este procedimiento, y la aplicación se puede realizar a los diagnósticos por procedimientos y principios similares. Preferentemente, se filtra de antemano la muestra de espécimen para retirar el exceso de materia extraña o contaminantes, para permitir un diagnóstico más rápido y mejorar la precisión del diagnóstico.

De acuerdo con la invención, en lugar de un procedimiento de depósito del espécimen directamente sobre la almohadilla de muestra, se puede depositar una dilución del espécimen en un factor de dilución deseado en una solución de tratamiento preparada con una composición prescrita. El propósito para el uso de una solución de tratamiento de espécimen puede ser la adición de componentes que facilitan la reacción del antígeno en el espécimen, componentes que descomponen contaminantes en el espécimen, componentes que atrapan contaminantes en el espécimen, componentes que reducen reacciones inespecíficas, componentes que facilitan el flujo de las partículas cromógenas, componentes que provocan agregación adecuada de las partículas cromógenas para mejorar la visibilidad cuando quedan atrapadas en la línea de prueba, o similares. Como ejemplos, se pueden añadir soluciones tamponadoras, tensioactivos, proteínas, sales inorgánicas, polímeros solubles en agua, agentes reductores, agentes quelantes y similares. Particularmente cuando se usan partículas cromógenas de acuerdo con la invención, es posible añadir un tensioactivo no iónico, diversos aminoácidos solubles en agua, proteínas, sales inorgánicas, polímeros solubles en agua o similares. Los tipos específicos de componentes y sus cantidades diferirán dependiendo del objetivo de examen y del tipo de anticuerpo usado, pero los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen éteres alquílicos de poli(oxietileno), éteres octilfenílicos de poli(oxietileno) y éteres nonilfenílicos de poli(oxietileno). Los ejemplos de aminoácidos solubles en agua incluyen asparagina, ácido aspártico, alanina, arginina, isoleucina, glicina, glutamina, ácido glutámico, cisteína, serina, tirosina, triptófano, treonina, valina, histidina, prolina, fenilalanina, metionina, lisina y leucina. Los ejemplos de proteínas incluyen caseína, leche desnatada, hidrolizado de caseína, seroalbúmina bovina y gelatina de pescado. Preferentes como sales inorgánicas son los compuestos que producen iones de metales alcalinos tales

como sodio, potasio y litio. Los polímeros solubles en agua preferentes son polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y otros derivados de celulosa. Además, estos componentes no solo se pueden añadir a la solución de tratamiento de espécimen, sino también añadir previamente a la almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, medio cromatográfico (membrana de nitrocelulosa) o similares.

5 No existen restricciones particulares sobre el tema que se puede diagnosticar con el kit de diagnóstico inmunocromatográfico de la invención, y como ejemplos específicos se pueden mencionar los siguientes: marcadores de cáncer, hormonas, enfermedades infecciosas, autoinmunidad, proteínas plasmáticas, TDM, coagulación/fibrinólisis, aminoácidos, péptidos, proteínas, genes y células. Más específicamente, estos incluyen
 10 CEA, AFP, ferritina, microglobulina β_2 , PSA, CA19-9, CA125, BFP, elastasa-1, pepsinógeno-1 y -2, sangre oculta en heces, microglobulina β_2 urinaria, PIVKA-2, BTA urinaria, insulina, E3, HCG, HPL, LH, antígeno VHC, antígeno HBs, anticuerpo HBs, anticuerpo HBc, antígeno HBe, anticuerpo HBe, anticuerpo HTLV-1, anticuerpo VIH, antígeno VIH, genes del virus VIH, anticuerpo antitoxoplásmico, sífilis, ASO, antígeno de gripe A, anticuerpo de gripe A, antígeno de gripe B, anticuerpo de gripe B, antígeno de rotavirus, antígeno de adenovirus, antígeno de rotavirus/adenovirus, *Streptococcus* Grupo A, *Streptococcus* Gr B, antígeno de cándida, bacterias CD, antígeno de *Cryptococcus*, bacterias de cólera, antígeno de meningococo, elastasa de granulocitos, anticuerpo de *Helicobacter pylori*, anticuerpo 0157, antígeno 0157, anticuerpo de *Leptospira*, antígeno de *Aspergillus*, MRSA, RF, IgE total, prueba LE, CRP, IgG, A, M, IgD, transferrina, albuminuria, transferrina urinaria, mioglobina, C3/C4, SAA, LP(a), α 1-AC, α 1-M, haptoglobina, microtransferrina, índica APR, FDP, dímero D, plasminógeno, AT3, α 2PI, PIC, PAI-1, proteína C, factor de coagulación X3, colágeno tipo IV, ácido hialurónico y GHbA1c, así como otros tipos diversos de antígenos, anticuerpos, virus, bacterias, aminoácidos, péptidos, proteínas, ADN, células, alérgenos, plaguicidas residuales y toxinas.

25 De acuerdo con la invención, las partículas cromógenas deben soportar una sustancia que se une específicamente a la sustancia que se va a detectar, tal como un anticuerpo, pero no existe una restricción particular sobre el procedimiento en el que se soporta. Por ejemplo, se puede aplicar por adsorción física, por enlace covalente o por una combinación de los mismos. El tipo y la cantidad de sustancia que se va a aplicar no están particularmente restringidos. En general, el tipo de sustancia que se va a aplicar más preferente es un anticuerpo. El procedimiento de soporte preferentemente se soporta por adsorción física desde el punto de vista
 30 de la facilidad, o se soporta por enlace covalente desde el punto de vista de estabilidad y rendimiento.

De acuerdo con la invención, el medio cromatográfico que se va a usar en el kit de diagnóstico inmunocromatográfico no está particularmente restringido, y se pueden usar diversos medios cromatográficos comúnmente usados. Más específicamente, puede ser una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa disponibles comercialmente se clasifican por el tiempo necesario para moverse a través de una distancia fija, conocido como el caudal, y las membranas con caudales más rápidos tienen tamaños de poro más grandes. De acuerdo con la invención, es preferente una membrana con un tamaño de poro más grande porque tiene un movimiento más rápido del espécimen y también resistencia a la obstrucción por las partículas cromógenas. Específicamente, es preferente una membrana con un caudal de más de 120 s/4 cm, es más preferente una membrana con un caudal de más de 100 s/4 cm, y es incluso más preferente una membrana con un caudal de más de 90 s/4 cm.

45 Los ejemplos para el procedimiento de preparación de partículas de celulosa, el procedimiento de coloración de las partículas de celulosa, el procedimiento de preparación de una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada y el procedimiento de preparación del kit de diagnóstico inmunocromatográfico se describirán con la comprensión implícita de que la invención de ninguna manera se restringe por las descripciones.

[Procedimiento de preparación de partículas de celulosa]

50 Se disuelve pelusa de celulosa en un buen disolvente para celulosa. Para la presente invención, se usó una solución de amoníaco de cobre preparada por un procedimiento conocido como buen disolvente. La solución de solidificación usada fue principalmente una mezcla de disolvente orgánico + agua + amoníaco. Se agitó la solución de solidificación mientras se añadía una solución de amoníaco de cobre-celulosa preparada, para la solidificación. Además, añadiendo ácido sulfúrico para neutralización y regeneración, es posible obtener una suspensión densa que contiene las partículas de celulosa deseadas. En un caso de este tipo, la suspensión densa será ácida debido al residuo del ácido usado para la regeneración, y también contendrá impurezas tales como sales de amonio generadas por neutralización, y por lo tanto se requiere un procedimiento para la purificación de una dispersión de celulosa compuesta de partículas de celulosa y el medio. El procedimiento de purificación usado para la invención es el tratamiento repetido con dilución líquida de medio de dispersión-decantación-separación centrífuga. Puesto que las partículas de celulosa en la dispersión de partículas de celulosa obtenida se agregarán a veces durante el transcurso del procedimiento de purificación, se puede llevar a cabo un tratamiento de dispersión por cizallamiento o similares en dichos casos. El medio usado para aplicar el cizallamiento para la invención es un homogeneizador de alta presión.

[Procedimiento de coloración de partículas de celulosa]

Se añaden sulfato de sodio y un tinte reactivo a la dispersión acuosa obtenida de partículas de celulosa, y se incrementa la temperatura hasta una temperatura adecuada en un baño termostático, mientras se agita con un agitador magnético. Después del incremento de temperatura, se añade carbonato de sodio como álcali y se inicia la tintura. Después de que haya transcurrido un tiempo prescrito, es posible obtener una suspensión densa que contiene las partículas de celulosa teñidas deseadas. Debido a que la suspensión densa es alcalina en este momento e incluye sulfato de sodio, tinte sin reaccionar y similares, es necesario llevar a cabo un procedimiento para la purificación a una dispersión de partículas de celulosa teñidas que comprende las partículas de celulosa teñidas y el medio. Se lleva a cabo la purificación por separación centrífuga de la misma manera que anteriormente, para obtener una dispersión de partículas de celulosa teñida. Puesto que las partículas de celulosa en la dispersión de partículas de celulosa teñidas obtenida se agregarán a veces durante el transcurso del procedimiento de purificación, se puede llevar a cabo un tratamiento de dispersión por cizallamiento o similares en dichos casos. El medio usado para aplicar el cizallamiento para la invención es un homogeneizador de alta presión. A continuación, se miden las propiedades físicas de las partículas de celulosa coloreadas obtenidas.

[Preparación de tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada]

Se extruye una solución madre obtenida disolviendo pelusa de algodón, que tiene la materia extraña retirada y que tiene un grado de polimerización ajustado, en una solución de cobre y amonio, desde una boquilla de hilado (hilera) que tiene un orificio (orificio de descarga de solución madre) y se deposita en un embudo conjuntamente con agua para la desamoniación para provocar la solidificación de la solución madre, mientras se estira y se carga sobre una red para formar una banda. Durante este tiempo, la oscilación en la dirección perpendicular a la dirección de la máquina a medida que avanza la red produce una curva Sin en las fibras que se cargan en la red. El estiramiento durante el hilado puede ser de un factor de 100 a 500, y cambiando la conformación del embudo de hilado y el volumen de flujo continuo de agua de hilado es posible ajustar la proporción de estiramiento según se desee. Al variar la proporción de estiramiento, es posible cambiar el tamaño del monofilamento o la resistencia de la tela no tejida. Para la formación de banda de tela no tejida, para obtener una orientación de fibra uniforme, la orientación de fibra como se carga en la red varía uniformemente en de 3 a 10 fases, con la fase de la curva Sin en unidades de capa, para formar una banda estratificada de 3 10 capas, permitiendo de este modo que se obtenga una tela no tejida celulósica con una orientación de fibra uniforme. Una tela no tejida de estructura multicapa que tiene dicha orientación de fibra uniforme tiene espacios de fibra uniformes y un tamaño de poro promedio regular como tela no tejida, y si se densifica la tela no tejida que tiene un tamaño de poro uniforme de este tipo, es posible obtener una tela no tejida que sea fina, densa y que tenga tamaños de poro uniformes. Además, variando el volumen y la temperatura del agua de hilado, es posible controlar la celulosa de bajo peso molecular, o hemicelulosa, que permanece en cantidades mínimas en la solución madre. Además, controlando la velocidad de desplazamiento de la red y el ancho de oscilación, es posible controlar la dirección de orientación de la fibra y controlar la resistencia y la ductilidad de la tela no tejida.

La conformación del embudo de hilado es preferentemente rectangular, y preferentemente la longitud del embudo de hilado que dirige el flujo hacia abajo es de 100 a 400 mm y el ancho de rendija de la salida de flujo descendente es de 2 a 5 mm. El diámetro del orificio de descarga de la solución madre de la hilera es preferentemente de 0,1 a 0,5 mm, y la conformación es preferentemente redonda. Además, en términos de garantizar la homogeneidad de la tela no tejida, la banda se estratifica preferentemente para formar una tela no tejida, siendo el número de capas preferentemente de 3 a 10. Por ejemplo, siguiendo el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa n.º 787914 o la publicación de patente japonesa n.º 877579, se lava la red estratificada después de regenerar la celulosa en forma de banda, y a continuación se enredan las fibras con un chorro de agua a alta presión para producir una tela no tejida. Se pueden producir orificios o irregularidades en la tela no tejida durante este tiempo para impartir una propiedad de diseño, por las condiciones de chorro de agua a alta presión y la forma de la red situada debajo y/o encima de la tela no tejida. La tela no tejida obtenida se puede obtener como un producto seco y enrollado. Esto se denomina una tela no tejida de filamento continuo debido a que se lleva a cabo una serie de etapas desde el hilado hasta el enrollamiento, de modo que las fibras se conectan continuamente sin romperse. A continuación, se miden las propiedades físicas de la tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerado obtenida.

[Procedimiento de preparación del kit de diagnóstico inmunocromatográfico]

Se prepara una dispersión de partículas de celulosa coloreadas ajustadas a una concentración prescrita, se añaden la solución tamponadora y el anticuerpo, y se lleva a cabo la agitación durante un tiempo prescrito mientras se ajusta la temperatura, para la adsorción del anticuerpo sobre las partículas de celulosa coloreadas. Después de agitar durante el tiempo prescrito, se añade adicionalmente un agente bloqueante y se continúa agitando durante un tiempo prescrito mientras se ajusta la temperatura, para el bloqueo de las partículas de celulosa coloreadas. El agente bloqueante usado puede ser cualquiera de diversos agentes bloqueantes dependiendo de la sustancia que se va a examinar o el espécimen, o la composición de su solución diluida. La caseína usada para la invención es particularmente preferente para el bloqueo de las partículas de celulosa coloreadas. Para el lavado de las partículas de celulosa coloreadas que se han sometido a adsorción de

anticuerpos y bloqueo, se lleva a cabo la separación centrífuga, se separan el líquido sobrenadante que contiene exceso de anticuerpo y agente bloqueante y las partículas precipitadas y se retira el líquido sobrenadante por decantación. Se añaden líquidos tales como una solución tamponadora a las partículas precipitadas y, si es necesario, se lleva a cabo un tratamiento de dispersión usando ondas ultrasónicas o similares. El lavado por la serie de procedimientos que incluye la precipitación por separación centrífuga, retirada del sobrenadante y adición de líquidos, se lleva a cabo el número de veces necesario, y se prepara una dispersión que contiene una concentración prescrita de las partículas que se han sometido a adsorción de anticuerpos y bloqueo. Según sea necesario, se añaden proteínas, tensioactivos o glúcidos tales como sacarosa o trehalosa a la dispersión, y se recubre la solución obtenida en una cantidad prescrita en una almohadilla de conjugado de polietileno y se seca para preparar una sección que contiene reactivo de detección. Además, si es necesario, se puede recubrir la tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada con una solución tamponadora, un tensioactivo, una proteína, un reactivo que atrapa contaminantes en la muestra de espécimen, un agente antiséptico, un agente antimicrobiano, un antioxidante, un humectante o similares, y se secaron para preparar la almohadilla de muestra. Además, se preparan un medio cromatográfico compuesto por membrana porosa de nitrocelulosa que inmoviliza un anticuerpo en una localización prescrita y una almohadilla absorbente de papel de celulosa para la absorción del anticuerpo. Estos se inmovilizan en una placa de montaje que tiene un sitio de unión llamado lámina de respaldo, y se cortan a un tamaño prescrito para preparar el kit de diagnóstico inmunocromatográfico.

[Ejemplos]

La presente invención se explicará ahora con más detalle a través de los siguientes ejemplos. Todos los procedimientos que no se describen en particular se llevaron a cabo en un entorno con una temperatura de 23 °C y una humedad relativa de un 55 %.

[Medición del diámetro de partícula promedio de las partículas cromógenas]

El aparato usado fue un analizador de distribución del tamaño de partícula Nanotrak UPA-EX150 (tipo de dispersión de luz dinámica) por Nikkiso Co., Ltd. La muestra de medida usada fue una muestra que comprendía un 0,01 % en peso de partículas cromógenas y un 99,99 % en peso de agua purificada. Las condiciones de medición fueron un número de barridos de 30 y un tiempo de medición de 30 segundos por medición, y se usó la distribución de tamaño de partícula promedio en volumen, registrando la mediana del diámetro como diámetro de partícula promedio. Además, la desviación estándar de la distribución del tamaño de partícula y el diámetro de partícula promedio obtenido de los 30 barridos se usaron para calcular el valor de CV.

[Medición de la intensidad de color de las partículas cromógenas]

El aparato usado fue un espectrofotómetro ultravioleta/visible/de infrarrojo cercano JASCO V-650 por JASCO Corp. (sistema óptico: monocromador individual, montaje Czerny-Turner, sistema de doble haz, fuente de luz: lámpara de deuterio (190 a 350 nm), lámpara halógena (330 a 900 nm)) con una unidad de esfera integradora montada ISV-722 del mismo fabricante. La muestra usada para la medición fue una dispersión acuosa de partículas cromógenas a una concentración arbitraria, o partículas secas, ajustadas a una concentración de un 0,01 % en peso de partículas cromógenas y un 99,99 % en peso de agua purificada usando agua destilada como medio de dispersión. La dispersión acuosa ajustada a la concentración se añadió en una cantidad de 2,5 ml a una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria óptica de 10 mm (volumen: 3,5 ml, ancho de trayectoria óptica: 10 mm), y la celda de cuarzo se ajustó en el portamuestras de un espectrofotómetro ultravioleta/visible/infrarrojo cercano, sobre el que se llevó a cabo la medición. De los máximos de absorbancia obtenidos, el máximo (ABS) en el intervalo de luz visible de 400 a 800 nm se registró como la intensidad de color.

[Cálculo de la proporción de colorante en partículas cromógenas]

Esto se calculó a partir del peso de partículas cromógenas después del número prescrito de procedimientos de coloración, y el peso de las partículas antes de la coloración. Por ejemplo, cuando se coloreó 1,0 g de partículas de celulosa y se obtuvieron 2,5 g de partículas de celulosa coloreadas, se calculó el colorante como $2,5 \text{ g} - 1,0 \text{ g} = 1,5 \text{ g}$. La proporción de colorante en este caso es de $1,5 \text{ g} \div 2,5 \text{ g} \times 100 = 60,0 \%$ en peso.

[Cálculo de la proporción de componente derivado de celulosa de partículas cromógenas]

Como se explica anteriormente, se realizó el cálculo por la fórmula: "proporción de componente derivado de celulosa de las partículas cromógenas" = $100 \% - (\text{proporción del colorante en las partículas cromógenas})$.

[Medición de la proporción L/D de partículas cromógenas]

El aparato usado fue un microscopio electrónico de barrido JSM-6700 de JEOL Corp. Se depositó una muestra con un 0,01 % en peso de partículas cromógenas y un 99,99 % de agua purificada sobre una placa de mica, y después de 10 segundos las partículas cromógenas se adsorbieron en la placa de mica, se limpió el exceso de

líquido con un Kimwipe y se dejó secar. Se recubrió la placa de mica obtenida con platino para preparar una muestra para la medición con microscopio electrónico. Esto se observó a un voltaje de aceleración de 1,6 kV y un aumento de medición de 50.000x, se tomaron varias imágenes según fue necesario para al menos 100 imágenes de partículas, y se midió el diámetro largo (L) y el diámetro corto (D) de cada una de las partículas y se usó para calcular el valor promedio de L/D de 100 partículas.

[Medición del grosor de la tela no tejida]

Esto se midió por la prueba de grosor de JIS-L1096, con una carga de 1,96 kPa (unidades: mm).

[Medición del peso base de la tela no tejida]

Se secó una tela no tejida con un área de al menos 0,5 m² a 105 °C hasta un peso fijo, y a continuación se dejó reposar durante al menos 16 horas en una cámara termostática a 20 °C, 65 % HR, se midió el peso, y se midió el peso por unidad de área de la tela no tejida (unidades: g/m²).

[Medición de la densidad aparente de la tela no tejida]

Esto se calcula dividiendo el peso por unidad de área de la tela no tejida entre el grosor (unidades: g/cm³).

[Medición del número de pérdida de fibra de la tela no tejida]

Se dispuso una muestra de 25 cm x 25 cm en 300 ml de agua purificada y se dejó reposar durante 2 minutos. Se contó el número de fibras perdidas que tuvieron tamaños de 100 μm o mayores con un videomicroscopio, después de retirar la muestra y filtrar el fluido restante con papel de filtro negro (ADVANTEC NO131), fijar el papel de filtro después de la filtración en una cámara termostática (20 °C, 65 % RH) durante 12 horas y secar (unidades: número/m²).

[Medición del tiempo de diagnóstico con kit de diagnóstico inmunocromatográfico]

Se dispuso el kit de diagnóstico inmunocromatográfico cortado a un ancho de 5 mm en una carcasa de plástico. Se midió el kit de diagnóstico así obtenido en la carcasa usando un C10066-10 Immunochromato-Reader de Hamamatsu Photonics, K.K. Se ajustó el aparato de acuerdo con el color de las partículas usadas. Se usó gonadotropina coriónica humana (en adelante, "hCG") como sustancia que se va a examinar, diluyendo la hCG con tampón de fosfato 66 mM (en adelante, "PBS") a pH 7,4 que contenía un 1 % en peso de seroalbúmina bovina (en adelante, "BSA"), para preparar un espécimen positivo con una concentración de hCG de 10 mUI/ml. Se depositó una porción de 120 μl del espécimen positivo en la sección de depósito de muestras del kit de diagnóstico, y se realizó la medición con el Immunochromato-Reader cada 20 segundos a partir de entonces, determinando el cambio en la TL con el tiempo. El motivo de la medición cada 20 segundos es que se necesitan menos de 20 segundos para cada medición. Se registró el tiempo para el que la intensidad de color de la TL obtenida por el Immunochromato-Reader (unidades: mABS) era de 20 mABS o más. El motivo para el índice de 20 mABS se debe a que la presencia de una TL se hace visible a 20 mABS o mayor, dependiendo la variación de las diferencias individuales. La medición se realizó 5 veces, y el tiempo promedio se registró como tiempo de diagnóstico.

[Medición de la reproducibilidad con kit de diagnóstico inmunocromatográfico]

De la misma manera que anteriormente, se depositó un espécimen positivo de 120 μl sobre la sección de depósito de muestra del kit de diagnóstico, y después de que hayan transcurrido 15 minutos, se midió la intensidad de color TL con un Immunochromato-Reader. La medición se realizó 20 veces, se registró el valor promedio de los valores obtenidos como la intensidad TL, y se registró la desviación estándar como la desviación estándar de la intensidad TL. El índice %CV, que indica la reproducibilidad, se calculó por la siguiente fórmula (1).

$$\%CV = \text{desviación estándar de intensidad TL} / \text{intensidad TL} \times 100$$

[Fórmula (1)]

[Medición de falsa positividad con kit de diagnóstico inmunocromatográfico]

Se preparó una solución de PBS 66 mM a pH 7,4 que contenía un 1 % en peso de BSA como espécimen negativo. Se depositó un espécimen negativo de 120 μl sobre la sección de depósito de muestra del kit de diagnóstico, y después de que hayan transcurrido 15 minutos, se midió la intensidad de color TL con un Immunochromato-Reader. La medición se realizó 5 veces, definiéndose la falta de falsa positividad como un valor promedio de 5 mABS o menor. El motivo para el índice de 5 mABS se debe a que la presencia de una TL no se puede confirmar visualmente a 5 mABS o menor, dependiendo la variación de las diferencias individuales.

[Medición del límite de detección con kit de diagnóstico inmunocromatográfico]

5 Se prepararon especímenes positivos diluidos en serie con concentraciones de hCG de 3,20 mUI/ml, 1,60 mUI/ml, 0,80 mUI/ml, 0,40 mUI/ml, 0,20 mUI/ml, 0,10 mUI/ml, 0,05 mUI/ml y 0,025 mUI/ml. De la misma manera que anteriormente, se depositaron 120 µl sobre la sección de depósito de muestra del kit de diagnóstico, y después de que hayan transcurrido 15 minutos, se midió la intensidad de color TL con un Immunochromato-Reader. La medición se realizó 5 veces en cada concentración, y cuando el valor promedio de los valores obtenidos fue de al menos 20 mABS por encima del valor medido para el espécimen negativo se realizó un juicio de positividad, o cuando estaba por debajo, se consideró que estaba debajo del límite de detección. El límite inferior de la concentración de hCG que dio un juicio positivo se definió como el límite de detección.

[Ejemplo 1]

15 [Preparación de partículas de celulosa coloreadas sensibilizadas con anticuerpos]

Se dispuso una porción de 120 µl de partículas de celulosa coloreadas 1 al 1,0 % en peso (diámetro de partícula promedio: 352 nm, intensidad de color: 2,9 ABS, proporción de colorante: 49 %), preparadas por un procedimiento conocido, en un tubo de centrífuga de 15 ml, y a continuación se añadieron 240 µl de solución tamponadora Tris (50 mM, pH 7,0) y 120 µl de anticuerpo anti-hCG-α de ratón al 0,1 % (10-C25C, producto de Fitzgerald) y se agitó la mezcla durante 10 segundos con un vórtex. A continuación se dispuso en un secador ajustado a 37 °C y se dejó reposar durante 120 minutos. A continuación, se añadieron 14,4 ml de solución de bloqueo (ácido bórico 100 mM, pH 8,5) que contenía un 1,0 % en peso de caseína (030-01505 por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y la mezcla se dejó reposar adicionalmente durante 60 minutos en un secador a 37 °C. A continuación se usaron un separador centrífugo (6200 de Kubota Corp.) y un rotor de separación centrífuga (AF-5008C de Kubota Corp.) para la centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos, y tras la precipitación de las partículas sensibilizadas, se retiró el sobrenadante. A continuación, se añadieron 14,4 ml de tampón borato (ácido bórico 50 mM, pH 10,0) y el tratamiento se realizó durante 10 segundos con un dispersor ultrasónico (UH-50 por SMT Co.). A continuación se realizó la centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos, y tras la precipitación de las partículas sensibilizadas, se retiró el sobrenadante. Después de añadir 0,6 g de sacarosa (196-00015 por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 0,8 g de una solución de bloqueo de caseína al 1,0 % en peso, se usó tampón borato (ácido bórico 50 mM, pH 10,0) para ajustar el peso a 4,0 g, y se preparó una dispersión de partículas de celulosa coloreadas sensibilizadas con anticuerpos al 0,03 % en peso y se trató con el dispersor ultrasónico durante 10 segundos.

35 [Impregnación de partículas de celulosa coloreadas sensibilizadas con anticuerpos en almohadilla de conjugado y secado]

Se sumergió una almohadilla de conjugado de polietileno (6613 por Pall Co.) en un gran exceso de Tween-20 al 0,05 % en peso (T2700 por Sigma-Aldrich Japan, KK) y, después de retirar el exceso de líquido, se secó a 50 °C durante 60 minutos. A continuación se cortó en una conformación con una altura de 10 mm y una longitud de 300 mm. A continuación, se usó una micropipeta para recubrir uniformemente 1020 µl de la dispersión de partículas de celulosa coloreadas sensibilizadas con anticuerpos al 0,03 % en peso, después de esto se secó la almohadilla a 50 °C durante 60 minutos.

45 [Pretratamiento de la almohadilla de muestra de tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada]

Se impregnó una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1 (peso base: 57,2 g/m², grosor: 0,52 mm, densidad aparente: 0,11 g/cm³, número de pérdida de fibras: 2000), preparada por un procedimiento conocido, con solución tamponadora PBS (66 mM, pH 7,4) que contenía un gran exceso de un 2,0 % en peso de BSA (A7906 por Sigma-Aldrich Japan, KK) y un 2,0 % en peso de Tween-20, y después de eliminar el exceso de líquido, se secó a 50 °C durante 60 minutos. A continuación se cortó en una conformación con una altura de 20 mm y una longitud de 300 mm.

55 [Preparación de la membrana de nitrocelulosa recubierta con anticuerpo de captura]

Se cortó una membrana de nitrocelulosa (SHF0900425 de Millipore) en una conformación con una altura de 25 mm y una longitud de 300 mm. Se usó un aplicador de recubrimiento líquido (300DS por Musashi Engineering, Inc.) para el recubrimiento de una solución de PBS (66 mM, pH 7,4) que contenía un 0,1 % en peso de anticuerpo anti-hCG-p de ratón (6601 por MedixBiochemica) en una proporción de 0,1 µl/mm en una sección de 7 mm de alto. A continuación, se recubrió una solución de PBS (66 mM, pH 7,4) que contenía un 0,1 % en peso de anticuerpo anti-IgG de ratón de conejo (Z0259 de Daco Co.) a una proporción de 0,1 µl/mm en una sección de 12 mm de alto. A continuación, se secó a 37 °C durante 30 minutos.

65 [Preparación del kit de diagnóstico inmunocromatográfico]

En una hoja de respaldo (AR9020 por Adhesives Research) se unieron la membrana de nitrocelulosa recubierta con anticuerpo de captura preparada, una almohadilla absorbente (C083 por Millipore), la almohadilla de conjugado que contenía partículas de celulosa coloreadas sensibilizadas con anticuerpos y la almohadilla de muestra de tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada, en el diseño ilustrado en la fig. 1. A

5 continuación se cortó el diseño a un ancho de 5 mm con un cortador, para obtener un kit de diagnóstico inmunocromatográfico con un ancho de 5 mm y una altura de 60 mm.

[Evaluación del rendimiento del kit de diagnóstico inmunocromatográfico]

10 Se evaluó el rendimiento del kit de diagnóstico inmunocromatográfico obtenido. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Ejemplo 2]

15 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de celulosa coloreadas 2 (diámetro de partícula promedio: 588 nm, intensidad de color: 2,7 ABS, proporción de colorante: 45 %), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

20 [Ejemplo 3]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de celulosa coloreadas 3 (diámetro de partícula promedio: 790 nm, intensidad de color: 2,6 ABS, proporción de colorante: 42 %), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

25

[Ejemplo 4]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de celulosa coloreadas 4 (diámetro de partícula promedio: 185 nm, intensidad de color: 3,4 ABS, proporción de colorante: 61 %), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

30

[Ejemplo 5]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de celulosa coloreadas 5 (diámetro de partícula promedio: 394 nm, intensidad de color: 4,8 ABS, proporción de colorante: 75 %), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

35

[Ejemplo 6]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de celulosa coloreadas 6 (diámetro de partícula promedio: 332 nm, intensidad de color: 1,5 ABS, proporción de colorante: 32 %), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

40

[Ejemplo 7]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la tela no tejida usada en la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 2 (peso base: 72,0 g/m², grosor: 0,08 mm, densidad aparente: 0,90 g/cm³, número de pérdida de fibras: 1100), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

50

[Ejemplo 8]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la tela no tejida usada en la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 3 (peso base: 50,3 g/m², grosor: 0,75 mm, densidad aparente: 0,07 g/cm³, número de pérdida de fibras: 2100), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

60

[Ejemplo 9]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la tela no tejida usada en la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de filamento continuo de celulosa

65

ES 2 695 000 T3

regenerada 4 (peso base: 17,9 g/m², grosor: 0,13 mm, densidad aparente: 0,14 g/cm³, número de pérdida de fibras: 1500), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Ejemplo 10]

5 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la tela no tejida usada en la almohadilla de muestra fue una tela no tejida compuesta (peso base: 92,5 g/m², grosor: 0,30 mm, densidad aparente: 0,31 g/cm³, número de pérdida de fibras: 900) obtenida por hidrogenmarañado de una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada (peso base: 61,5 g/m²) y una tela no tejida de poliéster (peso base: 32,0 g/m²) con un chorro de agua, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Ejemplo 11]

15 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que se empleó el procedimiento Kinocloth como procedimiento de formación de una tela no tejida secada al aire, en la que se cortaron fibras de cupramonio en longitudes de fibra de 30 mm y se dispersaron en aire conjuntamente con un aglutinante hidrófilo para formar la estratificación, y se usó una tela no tejida de fibra cortada de celulosa regenerada 1 (peso base: 49,2 g/m², grosor: 0,24 mm, densidad aparente: 0,21 g/cm³, número de pérdida de fibras: 10.500) así preparada como almohadilla de muestra, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Ejemplo 12]

25 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las fibras usadas fueron fibras de lyocell y se preparó una tela no tejida de fibra cortada de celulosa regenerada 2 (peso base: 61,3 g/m², grosor: 0,50 mm, densidad aparente: 0,12 g/cm³, número de pérdida de fibras: 8900) por el mismo procedimiento que en el ejemplo 11 y se usó como almohadilla de muestra, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Ejemplo 13]

35 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las fibras usadas fueron fibras de rayón y se preparó una tela no tejida de fibra cortada de celulosa regenerada 3 (peso base: 31,7 g/m², grosor: 0,19 mm, densidad aparente: 0,17 g/cm³, número de pérdida de fibras: 10.000) por el mismo procedimiento que en el ejemplo 11 y se usó como almohadilla de muestra, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Explicación de los ejemplos 1 a 13]

40 En todos los ejemplos 1 a 13, usando partículas cromógenas prescritas con diámetros de partícula grandes e intensidad de color alta conjuntamente con una almohadilla de muestra que era una tela no tejida prescrita fabricada de fibras celulósicas regeneradas, que tenía baja densidad aparente y bajo grosor, fue posible obtener un kit de diagnóstico inmunocromatográfico con una coloración rápida, que presentaba coloración de línea en 1 minuto, un tiempo de diagnóstico corto, alta sensibilidad de análisis y reproducibilidad excelente de los resultados, como se muestra en la tabla 1 a continuación.

[Ejemplo comparativo 1]

50 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de celulosa coloreadas 7 con diámetros de partícula pequeños (diámetro de partícula promedio: 69 nm, intensidad de color: 2,8 ABS, proporción de colorante: 48 %), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Como se observa claramente por los resultados mostrados en la tabla 1, un diámetro de partícula promedio pequeño de las partículas cromógenas dio como resultado la coloración de línea después de 1 minuto, un tiempo de diagnóstico lento y una sensibilidad de análisis baja.

[Ejemplo comparativo 2]

60 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de celulosa coloreadas 8 con diámetros de partícula grandes (diámetro de partícula promedio: 1017 nm, intensidad de color: 2,4 ABS, proporción de colorante: 41 %), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Como se observa claramente por los resultados mostrados en la tabla 1, un diámetro de partícula promedio grande de las partículas cromógenas dio como resultado la obstrucción de partículas, o algún retraso en el tiempo de diagnóstico, dando lugar a una

65

mala reproducibilidad y también a una falsa positividad. La almohadilla de conjugado o membrana de nitrocelulosa también se coloreó.

[Ejemplo comparativo 3]

5 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron partículas de látex coloreadas (diámetro de partícula promedio: 351 nm, intensidad de color: 0,4 ABS, proporción de colorante desconocida), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Como se observa claramente por los resultados que se muestran en la
10 tabla 1, cuando las partículas cromógenas fueron partículas de látex, la intensidad de color de la partícula fue baja, el tiempo de diagnóstico fue lento y la sensibilidad de análisis fue baja.

[Ejemplo comparativo 4]

15 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron coloide de oro (diámetro de partícula promedio: 63 nm, intensidad de color: 2,3 ABS), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Como se observa claramente por los resultados en la tabla 1, cuando las partículas cromógenas fueron partículas de coloide de oro, el diámetro de partícula fue pequeño, el tiempo de diagnóstico fue lento, la sensibilidad de análisis fue baja y
20 la reproducibilidad de los resultados fue mala.

[Explicación de los ejemplos comparativos 1 a 4]

25 Como se observa claramente por comparación entre los ejemplos 1 a 13 y los ejemplos comparativos 1 a 4, cuando los diámetros de partícula de las partículas cromógenas no estaban dentro del intervalo óptimo o la intensidad de color fue baja, como en los ejemplos comparativos 1 a 4, no fue posible proporcionar un kit de diagnóstico que presentara simultáneamente todas las propiedades deseadas para tiempo de examen, sensibilidad de análisis, reproducibilidad de los resultados y presencia o ausencia de falsa positividad.

30 [Ejemplo comparativo 5]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada de peso base bajo 5 (peso base: 9,1 g/m², grosor: 0,12 mm, densidad aparente: 0,08 g/cm³, número de pérdida de fibras: 2900), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Cuando el peso base
35 de la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas usadas para la almohadilla de muestra fue baja, algunos de los kits de diagnóstico tenían fugas de una porción del fluido de espécimen desde la parte superior del kit de diagnóstico, y no se pudo suministrar volumen de líquido suficiente a la almohadilla de conjugado, dando como resultado una mala liberación de las partículas. Por lo tanto, algunos de los kits de diagnóstico tuvieron un tiempo de diagnóstico lento, sensibilidad de análisis baja y, en consecuencia, mala reproducibilidad de los resultados. Además, en la fase de pretratamiento de la almohadilla de muestra, el manejo en húmedo fue malo y la manipulación fue difícil.

[Ejemplo comparativo 6]

45 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 6 que tenía un peso base alto y un grosor grande (peso base: 170 g/m², grosor: 1,09 mm, densidad aparente: 0,16 g/cm³, número de pérdida de fibras: 2900), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a
50 continuación. Cuando la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas usadas en la almohadilla de muestra tuvo un peso base alto y un grosor grande, la liberación de las partículas de la almohadilla de conjugado fue mala, posiblemente porque la propia almohadilla de muestra retuvo cierto grado de volumen de líquido, mientras que el tiempo de diagnóstico fue lento y la reproducibilidad de los resultados fue mala. La almohadilla de conjugado o membrana de nitrocelulosa también se coloreó.

[Ejemplo comparativo 7]

55 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada de grosor pequeño 7 (peso base: 57,2 g/m², grosor: 0,05 mm, densidad aparente: 1,14 g/cm³, número de pérdida de fibras: 1000), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Cuando la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas usadas en la almohadilla de muestra tuvo un grosor pequeño, la liberación de las partículas de la almohadilla de conjugado fue mala, posiblemente porque la densidad aparente fue alta, la velocidad de absorción del líquido fue mala y el caudal por unidad el tiempo no fue suficiente, mientras que el tiempo de diagnóstico también fue lento y la reproducibilidad de los resultados fue mala. La almohadilla de conjugado o membrana de nitrocelulosa también se coloreó.
60
65

[Ejemplo comparativo 8]

5 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de fibra cortada de pulpa 1 (peso base: 68,0 g/m², grosor: 0,16 mm, densidad aparente: 0,43 g/cm³, número de pérdida de fibras: 9200), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Cuando se usó una tela no tejida de fibra cortada de pulpa en la almohadilla de muestra, la liberación de las partículas de la almohadilla de conjugado fue mala, posiblemente porque la hidrofiliidad de las propias fibras fue baja y el caudal por unidad de tiempo no fue suficiente, mientras que el tiempo de diagnóstico también fue lento y la reproducibilidad de los resultados fue mala. La almohadilla de conjugado o membrana de nitrocelulosa también se coloreó.

[Ejemplo comparativo 9]

15 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que la almohadilla de muestra fue una tela no tejida de fibra cortada de pulpa 2 (almohadilla de muestra de inmunocromatografía disponible comercialmente, peso base: 179,0 g/m², grosor: 0,48 mm, densidad aparente: 0,37 g/cm³, número de pérdida de fibras: 11.100), y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Cuando se usó una tela no tejida de fibra cortada de pulpa en la almohadilla de muestra, la liberación de las partículas de la almohadilla de conjugado fue mala, posiblemente porque la hidrofiliidad de las propias fibras fue baja y el caudal por unidad de tiempo no fue suficiente, mientras que el tiempo de diagnóstico también fue lento y la reproducibilidad de los resultados fue mala. La almohadilla de conjugado o membrana de nitrocelulosa también se coloreó.

25 [Explicación de los ejemplos comparativos 5 a 9]

Como queda claro por comparación entre los ejemplos 1 a 13 y los ejemplos comparativos 5 a 9, cuando el peso base y el grosor de la tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas usadas en la almohadilla de muestra se fabricaron de fibras distintas de las fibras celulósicas regeneradas, como se muestra en la tabla 1, no fue posible proporcionar un kit de diagnóstico que presentara todas las propiedades deseadas para tiempo de diagnóstico, sensibilidad de análisis, reproducibilidad de los resultados y presencia o ausencia de falsa positividad.

35 [Ejemplo comparativo 10]

Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron el coloide de oro usado en el ejemplo comparativo 4 y la almohadilla de muestra fue la tela no tejida de fibra cortada de pulpa 2 usada en el ejemplo comparativo 9, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Con esta combinación, el tiempo de diagnóstico fue muy lento, la sensibilidad de análisis fue baja y la reproducibilidad de los resultados fue mala.

[Ejemplo comparativo 11]

45 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que las partículas cromógenas fueron las partículas de látex coloreadas usadas en el ejemplo comparativo 3 y la almohadilla de muestra fue la tela no tejida de fibra cortada de pulpa 2 usada en el ejemplo comparativo 9, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Con esta combinación, el tiempo de diagnóstico fue muy lento, la sensibilidad de análisis fue baja y la reproducibilidad de los resultados fue mala.

50 [Comparación de los cambios en TL con el tiempo en el ejemplo 1, ejemplo comparativo 4, ejemplo comparativo 9 y ejemplo comparativo 10]

Usando los resultados de la medición del tiempo de diagnóstico con los kits de diagnóstico inmunocromatográfico llevados a cabo en el ejemplo 1, ejemplo comparativo 4, ejemplo comparativo 9 y ejemplo comparativo 10, se realizó una comparación entre los cambios en la intensidad de color de TL con el tiempo. Los resultados se muestran en la fig. 5. Como se observa claramente a partir de la fig. 5, el ejemplo comparativo 4 y ejemplo comparativo 10 que usaron coloide de oro para las partículas cromógenas no se vieron afectados en gran medida por la almohadilla de muestra. Además, el ejemplo comparativo 9 que usó una almohadilla de muestra de inmunocromatografía de producto comercial para la almohadilla de muestra, aunque usó partículas cromógenas específicas, tuvo una intensidad de color moderadamente incrementada incluso después de que hubiera transcurrido un tiempo. Esto se debe a que la velocidad de absorción de líquido de la almohadilla de muestra no fue suficiente y el caudal del fluido de espécimen por unidad de tiempo fue lenta, y por lo tanto las partículas cromógenas se continuaron liberando de la almohadilla de conjugado. Por el contrario, la intensidad de color fue muy alta en el ejemplo 1, y la intensidad de color se estabilizó rápidamente. Este es un efecto de la combinación de las partículas cromógenas prescritas y la almohadilla de muestra prescrita de acuerdo con la invención, lo que apoya la conclusión de que las partículas se liberaron de la almohadilla de conjugado en una etapa anterior.

Cuando se llevó a cabo la evaluación del rendimiento exactamente en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, ejemplo comparativo 4 y ejemplo comparativo 9, excepto que se cambió el sistema de hCG por un sistema de gripe, se confirmó el mismo efecto en el sistema de gripe que en el sistema de hCG.

5

[Efecto del factor de cobertura de la almohadilla de muestra sobre la almohadilla de conjugado]

[Ejemplo 14]

10 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que el factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado se cambió a un 70 % usando una longitud de almohadilla de muestra de 17 mm, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

15 [Ejemplo 15] (no de acuerdo con la invención)

20 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que el factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado se cambió a un 50 % usando una longitud de almohadilla de muestra de 15 mm, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

[Ejemplo comparativo 12]

25 Se preparó un kit de diagnóstico inmunocromatográfico por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que el factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado se cambió a un 20 % usando una longitud de almohadilla de muestra de 12 mm, y se evaluó el rendimiento. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

30 Como se observa claramente por los resultados en la tabla 2, el cambio del factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado no cambió el tiempo de coloración, pero a veces afectó a la reproducibilidad de los resultados.

[Tabla 1]

	Partículas cromógenas			Almohadilla de muestra					Resultados de inmunocromatografía					
	Tipo	Diámetro de partícula promedio (nm)	Intensidad de color (ABS)	Tipo	Peso base (g/m ²)	Grosor (mm)	Densidad aparente (g/cm ³)	Número de pérdida de fibras (1000)	Tiempo de coloración (s)	Intensidad de TL (mABS)	D.E. intensidad de TL (mABS)	% CV	Límite de detección (mU/ml)	Falsa positividad
Ejemplo 1	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	20	502	6,8	1,4	0,050	No
Ejemplo 2	Partículas de celulosa coloreadas 2	588	2,7	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	24	621	10,9	1,8	0,025	No
Ejemplo 3	Partículas de celulosa coloreadas 3	790	2,6	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	32	641	13,6	2,1	0,025	No
Ejemplo 4	Partículas de celulosa coloreadas 4	185	3,4	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	28	387	5,8	1,5	0,100	No
Ejemplo 5	Partículas de celulosa coloreadas 5	394	4,8	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	20	598	9,5	1,6	0,025	No
Ejemplo 6	Partículas de celulosa coloreadas 6	332	1,5	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	28	389	4,5	1,2	0,100	No
Ejemplo 7	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 2	72,0	0,08	0,90	1,1	20	495	7,9	1,6	0,050	No
Ejemplo 8	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 3	50,3	0,75	0,07	2,1	20	513	8,3	1,6	0,050	No

Ejemplo 9	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 4	17,9	0,13	0,14	1,5	20	525	6,6	1,3	0,050	No
Ejemplo 10	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Éster/filamento continuo de celulosa regenerada	92,5	0,30	0,31	0,9	28	500	9,1	1,8	0,050	No
Ejemplo 11	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida regenerada de fibra cortada de celulosa regenerada 1	49,2	0,24	0,21	10,5	36	475	6,6	1,4	0,050	No
Ejemplo 12	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida regenerada de fibra cortada de celulosa regenerada 2	61,3	0,50	0,12	8,9	36	465	7,1	1,5	0,050	No
Ejemplo 13	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida regenerada de fibra cortada de celulosa regenerada 3	31,7	0,19	0,17	10,0	40	430	6,8	1,6	0,050	No
Ej. comp. 1	Partículas de celulosa coloreadas 7	69	2,8	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	80	210	3,9	1,9	0,800	No
Ej. comp. 2	Partículas de celulosa coloreadas 8	1017	2,4	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	56	531	52,0	9,8	0,050	Sí
Ej. comp. 3	Partículas de látex coloreadas	351	0,4	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	120	135	2,1	1,6	1,600	No
Ej. comp. 4	Colorido de oro	63	2,3	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	57,2	0,52	0,11	2,0	104	231	21,0	9,1	0,800	No
Ej. comp. 5	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 5	9,1	0,12	0,08	2,9	32	512	14,5	2,8	0,050	No
Ej. comp. 6	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 6	170,0	1,09	0,16	2,9	68	399	15,5	3,9	0,100	No
Ej. comp. 7	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 7	57,2	0,05	1,14	1,0	72	315	13,0	4,1	0,100	No
Ej. comp. 8	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de fibra cortada de pulpa 1	68,0	0,16	0,43	9,2	72	412	12,9	3,1	0,100	No
Ej. comp. 9	Partículas de celulosa coloreadas 1	352	2,9	Tela no tejida de fibra cortada de pulpa 2	179,0	0,48	0,37	11,1	84	395	13,5	3,4	0,100	No
Ej. comp. 10	Colorido de oro	63	2,3	Tela no tejida de fibra cortada de pulpa 2	179,0	0,48	0,37	11,1	124	195	19,0	9,7	1,600	No
Ej. comp. 11	Partículas de látex coloreadas	351	0,4	Tela no tejida de fibra cortada de pulpa 2	179,0	0,48	0,37	11,1	142	165	17,0	10,3	1,600	No

[Tabla 2]

	Partículas cromógenas	Almohadilla de muestra				Resultados de inmunocromatografía			
		Tipo	Tipo	Longitud (mm)	Factor de cobertura en almohadilla de conjugado (%)	Tiempo de coloración (s)	Intensidad de TL (mABS)	D.E. intensidad de TL (mABS)	% CV (%)
Ejemplo 1	Partículas de celulosa coloreadas 1	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	20	100 %	20	502	6,8	1,4	
Ejemplo 14	Partículas de celulosa coloreadas 1	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	17	70 %	20	498	7,5	1,5	
Ejemplo 15 *	Partículas de celulosa coloreadas 1	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	15	50 %	20	481	8,0	1,7	
Ej. comp. 12	Partículas de celulosa coloreadas 1	Tela no tejida de filamento continuo de celulosa regenerada 1	12	20 %	20	459	12,0	2,6	

* no de acuerdo con la invención

Aplicabilidad industrial

5 El kit de diagnóstico inmunocromatográfico de la invención permite un diagnóstico rápido, tiene una sensibilidad de análisis alta, y también una reproducibilidad excelente de los resultados del examen, y por lo tanto se puede usar adecuadamente como reactivo de diagnóstico.

Explicación de los símbolos

- 10 (a) Almohadilla de muestra
- (b) Almohadilla de conjugado que contiene partículas cromógenas sensibilizadas con anticuerpos
- (c) Detector A (TL)
- 15 (d) Detector B (línea de control)
- (e) Medio cromatográfico
- 20 (f) Almohadilla absorbente
- (g) Placa de montaje
- (h) Sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra, con un factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado de un 100 %.
- 25 (i) Sección posterior más alejada de la almohadilla de muestra, con un factor de cobertura de la almohadilla de muestra en la almohadilla de conjugado de un 50 %.
- (j) Envoltura

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico que incluye una almohadilla de conjugado que contiene un conjugado que incluye partículas cromógenas con un diámetro de partícula promedio de 100 a 1000 nm y una intensidad de color de 1,0 a 10,0, siendo el peso de partícula de un 10 a un 90 % en peso derivado de celulosa y de un 90 a un 10 % en peso derivado de un colorante, y una almohadilla de muestra para un reactivo de diagnóstico *in vitro* compuesto de una tela no tejida fabricada de fibras celulósicas regeneradas, con un peso base de 10 a 150 g/m² y un grosor de 0,07 a 1,00 mm, en el que el factor de cobertura en la almohadilla de muestra para el reactivo de diagnóstico *in vitro* es de un 70 a un 100 % con respecto a la almohadilla de conjugado,

10 en el que se determina el factor de cobertura en base al área (A) en la sección donde se superponen la almohadilla de conjugado y la almohadilla de muestra y al área (B) de la almohadilla de conjugado completa que se determinan, y se realiza el cálculo por la siguiente fórmula:

15
$$\text{Factor de cobertura (\%)} = \frac{\text{área (A) de la sección superpuesta}}{\text{área total (B)}} \times 100;$$

20 y se determina la intensidad de color de las partículas cromógenas usando un espectrofotómetro ultravioleta/visible/infrarrojo cercano JASCO V-650 de JASCO Corp. (sistema óptico: monocromador individual, montaje Czerny-Turner, sistema de doble haz, fuente de luz: lámpara de deuterio (190 a 350 nm), lámpara halógena (330 a 900 nm) con una unidad de esfera integradora montada ISV-722 por el mismo fabricante, siendo la muestra usada para la medición una dispersión acuosa de partículas cromógenas a una concentración arbitraria, o partículas secas, en el que la muestra se ajusta a una concentración de un 0,01 % en peso de partículas cromógenas y un 99,99 % en peso de agua purificada usando agua destilada como medio de dispersión, añadiendo la dispersión acuosa ajustada por concentración en una cantidad de 2,5 ml a una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria óptica de 25 10 mm (volumen: 3,5 ml, ancho de trayectoria óptica: 10 mm), y colocando la celda de cuarzo en el portamuestras del espectrofotómetro ultravioleta/visible/infrarrojo cercano, llevando a cabo la medición y el registro de los picos de absorbancia obtenidos, la absorbancia en el máximo en el intervalo de luz visible de 30 400 a 800 nm como la intensidad de color.

- 35 2. Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las fibras celulósicas regeneradas se componen principalmente por fibras de rayón cupramónico.
3. Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las fibras celulósicas regeneradas son filamentos continuos.
- 40 4. Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el número de pérdida de fibra de la tela no tejida compuesta de fibras celulósicas regeneradas es menor que 5000/m².
5. Un kit de diagnóstico inmunocromatográfico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el colorante es un tinte reactivo.

FIG. 1

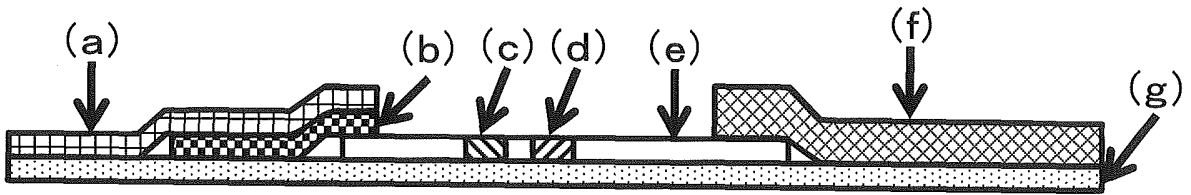


FIG. 2

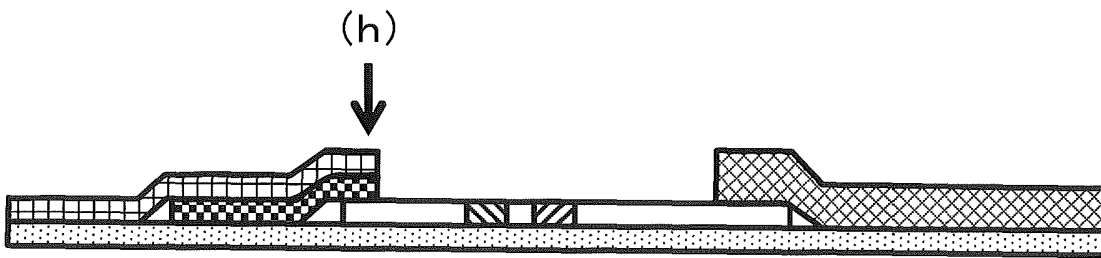


FIG. 3

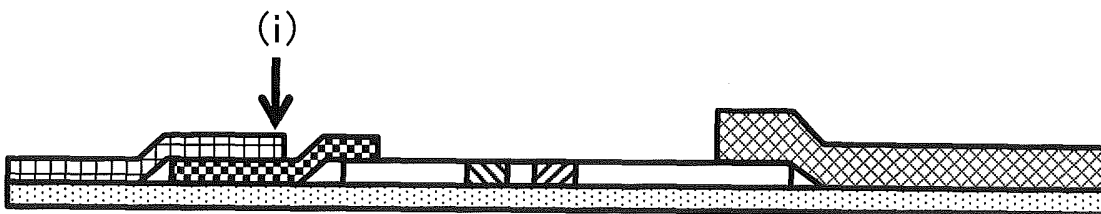


FIG. 4

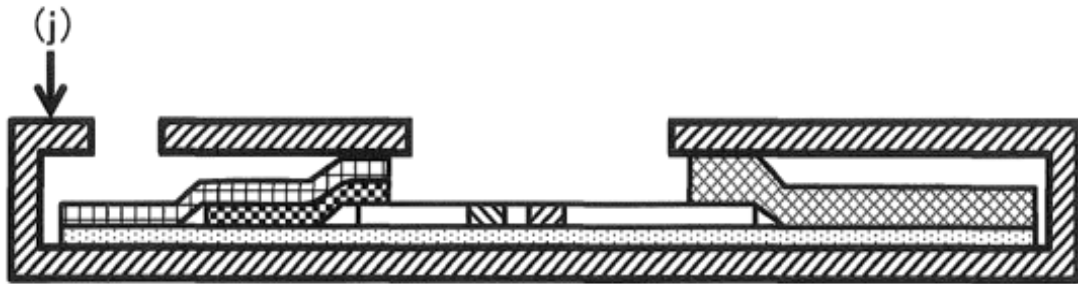


FIG. 5

