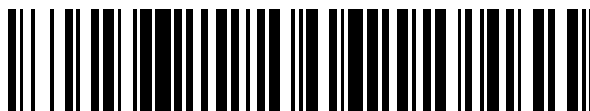


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 466**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/JP2014/056518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14142179**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14764277 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2975407**

54 Título: **Kit de examen**

30 Prioridad:

13.03.2013 JP 2013050974

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

06.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MIYAZAWA, TAKASHI y
SHINOHARA, YUKI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 752 466 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 examen

5 [Campo técnico]

La presente invención se relaciona con un kit de prueba que usa inmunocromatografía.

10 [Antecedentes de la técnica]

La inmunocromatografía es un ejemplo conocido de un método de inmunoensayo que detecta una sustancia específica que va a ser detectada usando un antígeno-anticuerpo u otra reacción específica.

15 La inmunocromatografía es un método de prueba ampliamente usado como una Prueba de Punto de Atención (POCT). Las POCT se realizan cerca del paciente en vez de enviar el espécimen del paciente a una instalación de pruebas de tal manera que el médico pueda evaluar rápidamente los resultados de prueba e iniciar inmediatamente el tratamiento. La inmunocromatografía se usa para diagnosticar infecciones derivadas de bacterias y virus, y particularmente infecciones en casos que involucran a recién nacidos o los ancianos que tienen fuerza inmune disminuida que requieren tratamiento inmediato, y se requiere para demostrar detección rápida y altamente sensible.

20 Se usan kits de prueba simples para ensayos basados en inmunocromatografía (véase PTL 1). Los kits de prueba son kits que consisten en (1) permitir que una muestra líquida se desarrolle corriente abajo mediante fenómeno capilar, y (2) detectar una sustancia que va a ser detectada en la muestra. Si la sustancia que va a ser detectada está contenida o no en la muestra líquida se determina mediante si se marca o no una línea de prueba proporcionada corriente abajo de la muestra líquida en la dirección de desarrollo.

25 La figura 12 es una vista lateral de un kit de prueba de la técnica anterior que usa inmunocromatografía. Un kit de prueba a tiene un cuerpo de kit b, el cual detecta una sustancia que va a ser detectada al desarrollar una muestra líquida, una almohadilla absorbente c, la cual recoge la muestra líquida corriente abajo del cuerpo de kit b, y una lámina d sobre la cual se instalan el cuerpo de kit b y la almohadilla absorbente c. El cuerpo de kit b tiene una pluralidad de miembros, y más específicamente, una almohadilla de goteo de líquido e, una almohadilla de retención de sustancia marcadora f y una membrana inmovilizadora g. Al menos algunos de estos miembros e hasta g están conectados mutuamente para permitir el desarrollo de la muestra líquida. Lo siguiente proporciona una explicación de cada miembro del cuerpo de kit b.

30 La almohadilla de goteo de muestra e es una almohadilla para que gotee la muestra líquida.

35 La almohadilla de retención de sustancia marcadora f es una almohadilla en la cual la sustancia marcadora se retiene uniformemente. La almohadilla de retención de sustancia marcadora f se fabrica impregnando una almohadilla con una solución que contiene la sustancia marcadora seguida por secado. Adicionalmente, la sustancia marcadora referida aquí se refiere a una sustancia en la cual una primera sustancia (anticuerpo o antígeno), la cual se une específicamente con una sustancia que va a ser detectada (antígeno o anticuerpo) en la muestra líquida, se inmoviliza en partículas portadoras insolubles, un ligando marcado con enzimas o un ligando marcado con fluorescencia que sirve como un marcador.

40 La membrana inmovilizadora g es una almohadilla en la cual una segunda sustancia (anticuerpo o antígeno), la cual se une específicamente con una sustancia que va a ser detectada en la muestra líquida, se inmoviliza en la forma de una línea.

45 Lo siguiente indica un procedimiento típico realizado cuando se usa el kit de prueba a mencionado anteriormente.

50 Cuando una muestra líquida gotea sobre la almohadilla de goteo de muestra e, la muestra líquida se desarrolla a través de la almohadilla de goteo de líquido e y fluye hacia la almohadilla de retención de sustancia marcadora f a través de una interfaz h con la almohadilla de retención de sustancia marcadora f. En la almohadilla de retención de sustancia marcadora f, la sustancia marcadora uniformemente retenida se hace fluir por la muestra líquida y fluye hacia la membrana inmovilizadora g junto con la muestra líquida a través de una interfaz i con la membrana inmovilizadora g. Además, la muestra líquida se desarrolla a través de la membrana inmovilizadora g y es absorbida por la almohadilla absorbente c a través de una interfaz j con la almohadilla absorbente c.

55 En el procedimiento mencionado anteriormente, en el caso de que una sustancia que va a ser detectada esté contenida en la muestra líquida, la sustancia que va a ser detectada se une con la primera sustancia de la sustancia marcadora. La segunda sustancia inmovilizada en la forma de una línea en la membrana inmovilizadora g se convierte en una muestra inmovilizada, y la sustancia que va a ser detectada que tiene una sustancia marcadora unida a la misma se une a ella y se captura en la forma de línea. Como un resultado, dado que la sustancia marcadora se captura en la forma de una línea, puede confirmarse al visualizar la línea de prueba marcada y se detecta la sustancia que va a ser detectada en la muestra.

[Lista de citas]

[Literatura de patente]

5

[PTL 1]

Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No. 2002-202307

10 Los siguientes son ejemplos de solicitudes de patentes relacionadas con kits de examen.

15 El documento WO 2008/16268 A1 se relaciona con una tira inmunocromatográfica y un kit que comprende la misma. La tira inmunocromatográfica se caracteriza porque comprende un refuerzo de plástico adhesivo, una almohadilla de muestra que recibe una muestra líquida para analizar, la cual está unida en la superficie de la porción superior del refuerzo de plástico adhesivo, una almohadilla conjugada acoplada a la almohadilla de muestra, la cual contiene un conjugado que se une específicamente a un analito en la muestra líquida desde la almohadilla de muestra, una almohadilla de detección de señal acoplada a la almohadilla conjugada, la cual comprende una zona de detección de señal para detectar la presencia del analito en la muestra líquida y una zona de control para confirmar si la muestra líquida migra cromatográficamente de manera independiente de la presencia del analito, y una almohadilla absorbente posicionada corriente abajo de la almohadilla de detección de señal, la cual absorbe la muestra líquida después de la compleción de la reacción de detección de señal y comprende un refuerzo poroso y un absorbente disperso, adsorbido, o recubierto en los poros del refuerzo poroso.

20 El documento US 2004/019301 A1 se relaciona con un dispositivo de prueba química por contacto de inmunoensayo de flujo lateral y el método integra la recolección de muestras, prueba de precibado, y recolección y almacenamiento de muestras de confirmación con un único dispositivo y un mínimo de etapas. Para usarse con una muestra de fluido oral absorbida directamente de la boca de una persona o cualquiera de una variedad de fluidos de muestra. Subsecuentemente la almohadilla de recolección de muestra se separa de una trayectoria de absorción para prevenir la migración continua, y reflujo hacia la almohadilla de recolección de muestra, de tal manera que la muestra de confirmación se conserva en la almohadilla de recolección de muestra.

25 El documento WO 2009/123592 A1 se relaciona con un sistema y método para determinar la presencia y/o concentración de uno o más analitos en una muestra que comprende un fluido, comprendiendo el sistema un sustrato que comprende una entrada o entradas de muestra y una o más trayectorias de flujos de determinación de analitos, comprendiendo cada trayectoria de flujo de determinación de analito un comienzo definido y un terminal definido y que comprende al menos una zona de captura que contiene un agente de captura para un analito, estando el agente o agentes de captura inmovilizados a lo largo de una porción de la trayectoria o trayectorias de flujo, estando la trayectoria o trayectorias de flujo diseñadas de tal manera que el uno o más analitos se agoten de la muestra y se unan a la porción de la trayectoria o trayectorias de flujo que contienen agente o agentes de captura inmovilizados, produciendo una región de extremo de agotamiento de analito para cada analito entre el comienzo y el terminal de la trayectoria de flujo de determinación de analito.

35 El documento JP 2007 086026 A se relaciona con un kit para inmunocromatografía capaz de detectar el material que va a ser detectado, sin usar una caja de almacenamiento o una gradilla para tubos de prueba. El kit para inmunocromatografía comprende un instrumento de prueba para inmunocromatografía para detectar un asunto objeto que va a ser inspeccionado en el espécimen; y un recipiente de prueba capaz de almacenar el espécimen. El instrumento de prueba comprende una parte de adición de espécimen que se sumerge en el espécimen almacenado en el recipiente de prueba; un marcador que mantiene parte para retener el material de marcador el cual genera la reacción antígeno-anticuerpo con el objeto de detección en el espécimen; y la parte de determinación, donde se fija la materia que genera la reacción antígeno-anticuerpo con el material que va a ser detectado. Puede ser detectado el recipiente de prueba, equipado con un gancho para retener el recipiente por suspensión, en un estado de estar suspendido por el gancho, el material que va a ser detectado.

40 El documento WO 2011/057025 A2 se relaciona con métodos y dispositivos para inmunoensayos rápidos de flujo lateral para detectar anticuerpos específicos dentro de una muestra líquida mientras que también validan la idoneidad de la muestra líquida para la presencia de inmunoglobulina y la integridad e inmunorreactividad de los reactivos de prueba que detectan los anticuerpos de interés, sin necesidad de instrumentación. Los métodos y dispositivos proporcionan el suministro de una muestra líquida diluida a una única ubicación que dirige simultáneamente el flujo líquido a lo largo de dos o más trayectorias de flujo separadas, una que sirve como un control positivo para confirmar que todos los reactivos críticos de la prueba son inmunorreactivos, y que la muestra que se prueba es adecuada, y la otra para detectar anticuerpos específicos si están presentes.

[Resumen de la invención]

65 [Problema técnico]

Se requieren kits de prueba que usen inmunocromatografía para demostrar una detección rápida y altamente sensible. De este modo, es necesario que se permita que una almohadilla de retención de sustancia marcadora se desarrolle hasta la ubicación de una línea de prueba en una membrana inmovilizadora tan rápido como sea posible, y que la sustancia marcadora se desarrolle de manera fiable de tal manera que no permanezca en las cercanías de la línea de prueba con el fin de facilitar la identificación de la línea de prueba.

Sin embargo, el desarrollo rápido y fiable puede inhibirse como resultado de que la sustancia marcadora termine siendo retenida en la almohadilla de retención de sustancia marcadora.

De este modo, un objetivo de la presente invención es proporcionar un kit de prueba que permita la detección rápida y altamente sensible.

[Solución al problema]

El kit de prueba es un kit para detectar una sustancia que va a ser detectada contenida en una muestra líquida al permitir que la muestra líquida se desarrolle en una dirección de desarrollo. Comprendiendo el kit de prueba una almohadilla de goteo, la cual contiene una porción sobre la cual gotea la muestra líquida; una almohadilla de retención de sustancia marcadora la cual está dispuesta corriente abajo de la almohadilla de goteo en la dirección de desarrollo de tal manera que al menos una porción de la almohadilla de retención de sustancia marcadora está en contacto con la almohadilla de goteo, y en la cual se retiene una sustancia marcadora con un marcador inmovilizado en una sustancia que se une específicamente con la sustancia que va a ser detectada; y una región en desarrollo, la cual tiene una zona de detección donde la sustancia marcadora se captura a través de la sustancia que va a ser detectada, en donde la región en desarrollo está dispuesta corriente abajo de la almohadilla de retención de sustancia marcadora en la dirección de desarrollo, y la cual permite que la sustancia marcadora se haya hecho fluir desde la almohadilla de retención de sustancia marcadora por la muestra líquida, para desarrollarse en la zona de detección. Adicionalmente, la absorbencia de la almohadilla de retención de sustancia marcadora se establece más alta que la absorbencia de la almohadilla de goteo, y una porción no contenedora que no contiene la sustancia marcadora se proporciona en una porción más lejana corriente arriba de la almohadilla de retención de sustancia marcadora.

Se inhibe que la muestra líquida que contiene la sustancia marcadora fluya de vuelta desde una región corriente abajo en la dirección de desarrollo a una región corriente arriba adyacente en la dirección de desarrollo, ya que la absorbencia de la región corriente abajo en la dirección de desarrollo se establece más alta que la absorción de la región corriente arriba en la dirección de desarrollo.

La porción no contenedora que no contiene la sustancia marcadora está dispuesta en una porción más lejana corriente arriba de la almohadilla de retención de sustancia marcadora donde la absorbencia es uniforme.

La almohadilla de goteo puede estar conectada solo a la porción no contenedora.

Una superficie de extremo de la región de goteo en el lado corriente abajo puede estar conectada a una superficie de extremo de la porción no contenedora en el lado corriente arriba.

La almohadilla de goteo y la almohadilla de retención de sustancia marcadora pueden estar formadas integralmente por un único miembro.

El único miembro puede ser un miembro fibroso que tenga absorbencia uniforme, y la región de retención de sustancia marcadora puede formarse al presionar una porción que sirve como la región de retención de sustancia marcadora.

En otras palabras: el kit de prueba tiene una región de goteo, la cual contiene una porción sobre la cual gotea una muestra líquida; una región de retención de sustancia marcadora, al menos una parte de la cual está conectada corriente abajo de la región de goteo en la dirección de desarrollo, y en la cual se retiene una sustancia marcadora con un marcador inmovilizado en una sustancia que se une específicamente con la sustancia que va a ser detectada; y una región en desarrollo, la cual tiene una zona de detección donde la sustancia marcadora se captura a través de la sustancia que va a ser detectada, al menos una porción de la cual está conectada corriente abajo de la región de retención de sustancia marcadora en la dirección de desarrollo, y la cual permite que la sustancia marcadora se haya hecho fluir desde la almohadilla de retención de sustancia marcadora por la muestra líquida, para desarrollarse en la zona de detección. Además, la absorbencia de la región de retención de sustancia marcadora se establece más alta que la absorbencia de la región de goteo, y una porción no contenedora que no contiene la sustancia marcadora se proporciona en una porción más lejana corriente arriba de la región de retención de sustancia marcadora.

[Efectos ventajosos de la invención]

De acuerdo con la presente invención, la detección puede llevarse a cabo rápidamente y con alta sensibilidad.

[Breve descripción de los dibujos]

La figura 1 es una vista superior que muestra un ejemplo de un kit de prueba de acuerdo con una primera realización.

5 La figura 2 es una vista lateral del kit de prueba de la figura 1.

La figura 3 es una vista lateral para explicar la disposición de una membrana inmovilizadora y una almohadilla de retención de sustancia marcadora.

10 La figura 4 es una vista lateral para explicar la disposición de una membrana inmovilizadora y una almohadilla de retención de sustancia marcadora.

La figura 5 es una vista superior que muestra un ejemplo de una caja que alberga un kit de prueba.

15 La figura 6 es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea A-A de la figura 5.

La figura 7 es una vista superior que muestra un ejemplo de un kit de prueba de acuerdo con una segunda realización.

20 La figura 8 es una vista superior que muestra una variación de un kit de prueba de acuerdo con una segunda realización.

La figura 9 es una vista superior de una primera almohadilla de la figura 8.

25 La figura 10 es un dibujo para explicar cómo una almohadilla de goteo y una almohadilla de retención de sustancia marcadora pueden estar formadas integralmente por un único miembro.

La figura 11 es un dibujo para explicar otra variación de cómo una almohadilla de goteo y una almohadilla de retención de sustancia marcadora pueden estar formadas integralmente por un único miembro.

30 La figura 12 es una vista superior que muestra un kit de prueba de la técnica anterior.

[Descripción de realizaciones]

35 Lo siguiente proporciona una explicación de varias realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos. Adicionalmente, en las siguientes explicaciones, las explicaciones duplicadas de aquellas porciones que tienen las mismas porciones estructurales y se indican con los mismos símbolos de referencia se omiten como una regla general dado que llevan a cabo la misma operación.

<<Primera realización>>

40 La figura 1 es una vista superior que muestra un ejemplo de un kit de prueba 1A de acuerdo con una primera realización. La figura 2 es una vista lateral del kit de prueba 1A de la figura 1. Lo siguiente proporciona una explicación del kit de prueba 1A de acuerdo con la primera realización con referencia a los dibujos.

45 <Configuración del kit de prueba>

50 El kit de prueba 1A es un kit que detecta una sustancia que va a ser detectada (anticuerpo o antígeno, para aplicar de manera similar de aquí en adelante) contenida en una muestra líquida al permitir que la muestra líquida se desarrolle en una dirección de desarrollo (la cual de aquí en adelante puede denominarse simplemente como la dirección de desarrollo). Más específicamente, si una sustancia que va a ser detectada está contenida o no en una muestra líquida se determina de acuerdo a si se marca o no una línea de prueba, la cual se proporciona corriente abajo de la muestra líquida que gotea sobre el kit de prueba 1A. La dirección de desarrollo de la muestra líquida se indica con una flecha en los dibujos.

55 El kit de prueba 1A tiene un cuerpo 10A de kit, una almohadilla 20 absorbente y una lámina 30. La lámina 30 es, por ejemplo, impermeable, y la superficie superior de la misma puede ser una lámina adhesiva ampliamente conocida. El cuerpo 10A de kit y la almohadilla 20 absorbente están conectados y dispuestos en la superficie superior de la lámina 30. El cuerpo 10A de kit permite la determinación de la presencia o ausencia de una sustancia que va a ser detectada (antígeno o anticuerpo, para aplicar de manera similar de aquí en adelante) al desarrollar una muestra líquida. La almohadilla 20 absorbente recoge la muestra líquida que ha sido desarrollada por el cuerpo 10A de kit.

60 <Explicación de cada miembro>

65 El cuerpo 10A de kit tiene una región de goteo en la forma de una almohadilla 11 de goteo de muestra, una región de retención de sustancia marcadora en la forma de una almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora, y una región en desarrollo en la forma de una membrana 15 inmovilizadora.

La almohadilla 11 de goteo de muestra está dispuesta más lejana corriente arriba en la dirección de desarrollo. La almohadilla 11 de goteo de muestra tiene una porción de goteo (no se muestra) sobre la cual gotea una muestra líquida. La almohadilla 11 de goteo de muestra tiene una absorbencia de agua prescrita. Más específicamente, la almohadilla 11 de goteo de muestra está formada con un miembro fibroso que tiene absorbencia comparativamente baja. Además, la almohadilla 11 de goteo de muestra está formada con un miembro fibroso que tiene aberturas comparativamente gruesas y una velocidad rápida de desarrollo de líquido.

Al menos una porción de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora está conectada corriente abajo de la almohadilla 11 de goteo de muestra en la dirección de desarrollo. Más específicamente, la porción de extremo en el lado corriente arriba de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora en la dirección de desarrollo está dispuesta superpuesta debajo de la porción de extremo del lado corriente abajo de la almohadilla 11 de goteo de muestra en la dirección de desarrollo. Como un resultado, una interfaz d1 está formada por la superficie superior de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora y la superficie inferior de la almohadilla 11 de goteo de muestra. La almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora tiene absorbencia de agua más alta y velocidad de desarrollo de líquido más lenta que la almohadilla 11 de goteo de muestra. Por ejemplo, la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora está formada con un miembro fibroso que tiene aberturas más finas que las de la almohadilla 11 de goteo de muestra. Además, la absorbencia de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora es uniforme. Se absorbe una muestra líquida a través de la interfaz d1 mediante la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora con una fuerza más fuerte que aquella durante el desarrollo por la almohadilla 11 de goteo de muestra.

Una sustancia marcadora se retiene en la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora. La almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora tiene una porción 13a no contenedora que no contiene una sustancia marcadora, y una porción 13b contenedora que contiene la sustancia marcadora. Adicionalmente, la interfaz d1 puede formarse al unir la superficie inferior de la almohadilla 11 de goteo de muestra a toda la superficie de la superficie superior de la porción 13a no contenedora como se muestra en la figura, o puede formarse al unir una porción de la superficie superior de la porción 13a no contenedora a la superficie inferior de la almohadilla 11 de goteo de muestra.

Aunque una sustancia marcadora puede retenerse uniformemente en la porción 13b contenedora, por ejemplo, no está limitada a la misma. Aquí, la sustancia marcadora se refiere a una sustancia en la cual una sustancia que se une específicamente a una sustancia (anticuerpo o antígeno, para aplicar de manera similar de aquí en adelante) que va a ser detectada en una muestra líquida se inmoviliza en partículas portadoras insolubles, un ligando marcado con enzimas o un ligando marcado con fluorescencia que sirve como un marcador. Ejemplos de partículas portadoras insolubles que sirven como un marcador incluyen coloides de oro, coloides de platino, partículas de color y partículas fluorescentes. La sustancia marcadora retenida en la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora se hace fluir por la muestra líquida y se desarrolla corriente abajo junto con la muestra líquida. En el caso de que una sustancia que va a ser detectada esté contenida en la muestra líquida, la sustancia marcadora se une específicamente con la sustancia que va a ser detectada dando como resultado un complejo marcado que se desarrolla hacia el lado corriente abajo.

Al menos una porción de la membrana 15 inmovilizadora está conectada corriente abajo de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora en la dirección de desarrollo. Más específicamente, la porción de extremo en el lado corriente arriba de la membrana 15 inmovilizadora en la dirección de desarrollo está dispuesta superpuesta debajo de la porción de extremo en el lado corriente abajo de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora en la dirección de desarrollo. Como un resultado se forma una interfaz d2 por la superficie superior de la membrana 15 inmovilizadora y la superficie inferior de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora. La membrana 15 inmovilizadora tiene absorbencia más alta y velocidad de desarrollo de líquido más lenta que la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora. Por ejemplo, la membrana 15 inmovilizadora está formada con un miembro fibroso (cuerpo de membrana) tal como una membrana de nitrocelulosa que tiene aberturas más finas que las de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora. La muestra líquida es absorbida a través de la interfaz d2 mediante la membrana 15 inmovilizadora con una fuerza más fuerte que aquella durante el desarrollo de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora.

Adicionalmente, aunque la porción 13b contenedora está dispuesta de tal manera que solo entra en contacto con la superficie superior de la membrana 15 inmovilizadora en la interfaz d2 en la figura 2, no está limitada a la misma. Por ejemplo, no solo la porción 13b contenedora, sino también la porción 13a no contenedora puede estar dispuesta de tal manera que entre en contacto con la superficie superior de membrana 15 inmovilizadora como se muestra en la figura 3. Además, una porción de la porción 13b contenedora, por ejemplo, puede estar dispuesta de tal manera que entre en contacto con la superficie superior de la membrana 15 inmovilizadora como se muestra en la figura 4.

La membrana 15 inmovilizadora tiene una región, en la cual se inmoviliza una sustancia (anticuerpo o antígeno, para aplicar de manera similar de aquí en adelante) que se une específicamente con una sustancia que va a ser detectada, en la forma de una zona 15a de detección (véase figura 1). La línea de prueba se marca como resultado de que el complejo marcado se une específicamente en la zona 15a de detección y que la sustancia marcadora se captura en la forma de una línea. Adicionalmente, aunque no se muestra en los dibujos, la membrana 15 inmovilizadora también puede tener una región en la cual una sustancia de control (anticuerpo o antígeno, para aplicar de manera similar de

aquí en adelante) se inmoviliza en la forma de una zona de control. La zona de control está preferiblemente dispuesta en el lado corriente abajo de la zona 15a de detección. En este caso, al retener además una sustancia marcadora de control, en la cual las partículas portadoras insolubles y similares para el marcado se han inmovilizado en una sustancia (antígeno o anticuerpo) que se une específicamente a la sustancia de control, en la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora, se puede confirmar que una muestra líquida (la cual incluye estas sustancias marcadoras) se ha desarrollado en la zona de control.

La almohadilla 20 absorbente es una almohadilla que absorbe la muestra líquida del cuerpo 10 de kit. Al menos una porción de la almohadilla 20 absorbente está conectada corriente abajo de la membrana 15 inmovilizadora en la dirección de desarrollo. Más específicamente, la porción de extremo en el lado corriente arriba de la almohadilla 20 absorbente en la dirección de desarrollo se coloca en la porción de extremo en el lado corriente abajo de la membrana 15 inmovilizadora en la dirección de desarrollo. Como un resultado, se forma una interfaz d3 por la superficie superior de la almohadilla 20 absorbente y la superficie inferior de la membrana 15 inmovilizadora. La muestra líquida es absorbida por la almohadilla absorbente a través de la interfaz d3.

Adicionalmente, aunque se muestran porciones de la almohadilla 11 de goteo de muestra, la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora y la almohadilla 20 absorbente que no entran en contacto con otros miembros en la figura 2 (y de manera similar en otras vistas laterales que también se describirán subsecuentemente) como estando separadas de la lámina 30, estas porciones pueden adherirse a la lámina 30.

Además, la superficie superior del kit de prueba 1A también se puede hacer para cubrirse con una cubierta que no se muestra hecha de un material impermeable. En este caso, la cubierta puede ser transparente para permitir la visualización de la línea de prueba, y se puede formar una abertura en la porción de goteo que permite que pase a través una muestra líquida.

Además, el kit de prueba 1A puede ser usado por el alojamiento en una caja. La figura 5 es una vista superior que muestra un ejemplo de una caja 50. La figura 6 es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea A-A de la figura 5.

La caja 50 tiene un cuerpo 52 de caja que aloja un kit 1 de prueba y una cubierta 51 que cubre el cuerpo 52 de caja. Una pluralidad de porciones 521 sobresalientes que posicionan el kit 1 de prueba se proporcionan en el cuerpo 52 de caja. Una abertura 511 para que gotee una muestra líquida sobre la almohadilla 11 de región de goteo de muestra y una abertura 512 para visualizar la línea de prueba en la membrana 15 inmovilizadora se forman en la cubierta 51. El kit de prueba 1A puede alojarse en la caja 50 mientras está cubierto con una cubierta o el kit de prueba 1A puede alojarse en la caja 50 tal como está. Adicionalmente, se pueden proporcionar tapones en la cubierta 51 y en la caja 52 para bloquear la cubierta 51.

<Explicación de cada función>

El kit de prueba 1A está provisto con una primera y/o segunda función para desarrollar rápidamente y de manera fiable una muestra líquida. La primera función es una función que inhibe que una muestra líquida que contiene una sustancia marcadora fluya de vuelta desde un miembro corriente abajo en la dirección de desarrollo a un miembro adyacente corriente arriba en la dirección de desarrollo. Más específicamente, la primera función se realiza mediante una configuración en la cual la absorbencia de la almohadilla 11 de goteo de muestra es menor que la absorbencia de la almohadilla de retención de sustancia marcadora. Como un resultado de emplear esta configuración, se inhibe el retroflujo de una muestra líquida que contiene una sustancia marcadora desde la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora a la almohadilla 11 de goteo de muestra. Además, la primera función se realiza mediante una configuración en la cual la absorbencia de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora es menor que la absorbencia de la membrana 15 inmovilizadora. Como un resultado de emplear esta configuración, se inhibe el retroflujo de una muestra líquida que contiene una sustancia marcadora desde la membrana 15 inmovilizadora a la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora.

La segunda función es una función que inhibe que una sustancia marcadora sea retenida en la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora cuando se desarrolla una muestra líquida desde la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora hasta la membrana 15 inmovilizadora. Aquí, la retención se refiere al flujo corriente arriba a corriente abajo de una muestra líquida que queda atrapada en una perturbación en el caso de que el flujo se haya perturbado, produciendo de esa manera que el flujo de la sustancia marcadora se estanque. Las perturbaciones en el flujo de una muestra líquida pueden ser producidas por los siguientes dos eventos.

Uno de los eventos es el resultado de la muestra líquida que fluye vigorosamente en la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora debido a la diferencia de absorbencia entre la alta absorbencia de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora en comparación con la almohadilla 11 de goteo de muestra. El otro es el resultado del deterioro de la interfaz d1 per se. Más específicamente, dado que los materiales fibrosos que tienen aberturas de diferentes tamaños entran en contacto en la interfaz d1, y hay una mínima brecha entre los dos miembros, se previene que la muestra líquida fluya suavemente.

Como se describió previamente, en el kit de prueba a de la técnica anterior, se usó la almohadilla de retención de sustancia marcadora f en la cual se retuvo uniformemente una sustancia marcadora a lo largo de la totalidad de la misma (véase figura 12). Por consiguiente, había el riesgo de que una muestra marcada fuera retenida en la misma como resultado de quedar atrapada en una perturbación del flujo de una muestra líquida producida por el flujo entrante desde la interfaz h. Además, la superficie inferior de la almohadilla de goteo de muestra e se unió a la superficie superior de la almohadilla de retención de sustancia marcadora f en un rango comparativamente amplio. Por consiguiente, el rango sobre el cual el líquido fluye desde la interfaz h es grande, la muestra líquida fluye hacia la almohadilla de retención de sustancia marcadora f con mayor intensidad que en el caso de fluir mediante gravedad utilizando solo el fenómeno capilar, y aumentan las perturbaciones en el flujo de la muestra líquida, produciendo de esa manera la retención de la sustancia marcadora.

La segunda función se realiza mediante una configuración en la cual la absorbencia de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora es uniforme, y la porción 13a no contenedora está dispuesta más lejana corriente arriba de la misma. Como un resultado de emplear esta configuración, en comparación con el caso de usar una almohadilla de retención de sustancia marcadora en la cual una sustancia marcadora se retiene uniformemente de la manera de la técnica anterior, dado que las absorbencias de la porción 13a no contenedora más lejana corriente arriba y la porción 13b contenedora son uniformes, hay poca perturbación del flujo de la muestra líquida en la porción donde está presente la sustancia marcadora, haciendo de esa manera posible reducir la cantidad de sustancia marcadora que se retiene como resultado de quedar atrapada en el flujo perturbado de la muestra líquida. Además, la segunda función se realiza mediante una configuración en la cual la almohadilla 11 de goteo de muestra solo entra en contacto con la porción 13a no contenedora. En este momento, la almohadilla 11 de goteo de muestra puede estar dispuesta en cualquier ubicación siempre que solo entre en contacto con la porción 13a no contenedora (o en otras palabras, siempre que la almohadilla 11 de goteo de muestra no entre en contacto con la porción 13b contenedora). Como un resultado de la disposición de esta manera, la muestra líquida se desarrolla al moverse hacia la almohadilla 11 de goteo de muestra, la porción 13a no contenedora, la porción 13b contenedora y la membrana 15 inmovilizadora en ese orden. De este modo, dado que una sustancia marcadora no se retiene debajo de la interfaz d2 donde fluye la muestra líquida, se puede reducir la retención de sustancia marcadora como resultado de haber quedado atrapada en una perturbación del flujo de la muestra líquida en las cercanías de la interfaz d2.

Además, como un resultado de inhibir la retención de la sustancia marcadora, la sustancia marcadora puede fluir desde la porción 13b contenedora a la membrana 15 inmovilizadora más rápidamente, y dado que esto subsecuentemente da como resultado el flujo de una muestra líquida en la cual casi nada de la sustancia marcadora está contenida en el mismo, es difícil que permanezca la sustancia marcadora.

<Comportamiento dentro de kit de prueba>

Lo siguiente proporciona una breve explicación de comportamiento dentro del kit de prueba 1A resultante del goteo de una muestra líquida.

Como se describió previamente, el orden de absorbencia de cada miembro del cuerpo 10A de kit es de tal manera que la absorbencia de la membrana 15 inmovilizadora es más alta seguida por la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora y la almohadilla 11 de goteo de muestra en ese orden. Como un resultado de la disposición de estos miembros de la manera descrita previamente, una muestra líquida que gotea en la almohadilla 11 de goteo de muestra del kit de prueba 1A fluye de la manera descrita a continuación.

(*) La muestra líquida se desarrolla a través de la almohadilla 11 de goteo de muestra y es absorbida a través de la interfaz d1 por la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora a una absorbencia más alta que la del desarrollo de la muestra líquida a través de la almohadilla 11 de goteo. En este momento, debido a la segunda función, la muestra líquida fluye hacia la porción 13a no contenedora, el flujo de la misma se rectifica en la porción 13a no contenedora, y la muestra líquida fluye ligeramente desde la porción 13a no contenedora hacia la porción 13b contenedora mientras que produce que la sustancia marcadora retenida en la porción 13b contenedora fluya.

(*) Después de haber fluido de la porción 13b contenedora, la sustancia marcadora es absorbida a través de la interfaz d2 por la membrana 15 inmovilizadora junto con la muestra líquida con una fuerza (absorbencia) que es más fuerte que cuando se desarrolla a través de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora. En este momento, la muestra líquida que queda en la porción 13a no contenedora produce que la sustancia marcadora fluya incluso después de que la mayoría de la sustancia marcadora haya fluido desde la porción 13b contenedora.

(*) En el caso de que una sustancia que va a ser detectada esté contenida en la muestra líquida, la sustancia marcadora se une a la sustancia que va a ser detectada durante el desarrollo dando como resultado la formación de un complejo marcado. Subsecuentemente, el complejo marcado se une a la muestra inmovilizada en la zona 15a de detección y se marca en la forma de una línea de prueba.

(*) La muestra líquida que se ha desarrollado a través de la membrana 15 inmovilizadora es absorbida por la almohadilla 20 absorbente después de haber alcanzado la interfaz d3.

Sobre la base de lo anterior, el kit de prueba 1A puede prevenir que la sustancia marcadora quede atrapada en una perturbación del flujo de la muestra líquida e inhibir la retención de la sustancia marcadora como resultado de que la muestra líquida fluya solo hacia la porción 13a no contenedora más lejana corriente arriba desde la interfaz d1 y subsecuentemente que fluya hacia la porción 13b contenedora que tiene absorbencia uniforme debido a la segunda función de la misma. Además, se puede prevenir el retroflujo a un miembro en el lado corriente arriba mediante la primera función incluso en el caso de que la sustancia marcadora haya quedado atrapada en una perturbación del flujo de la muestra líquida. Como un resultado de proporcionar estas funciones, la sustancia marcadora puede fluir hacia la membrana 15 inmovilizadora más rápidamente, permitiendo de esa manera que la muestra líquida restante promueva el flujo de la sustancia marcadora y haciendo posible llevar a cabo la detección rápidamente y con alta sensibilidad.

<<Segunda realización>>

La figura 7 es una vista superior que muestra un ejemplo de un kit de prueba de acuerdo con una segunda realización. Lo siguiente proporciona una explicación de un ejemplo de un kit de prueba 1B de acuerdo con la segunda realización con referencia a los dibujos.

Al menos una porción de una región de retención de sustancia marcadora en la forma de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora está conectada corriente abajo de una región de goteo en la forma de la almohadilla 11 de goteo de muestra en la dirección de desarrollo. Más específicamente, la superficie de extremo de una almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora adyacente en el lado corriente arriba en la dirección de desarrollo y la superficie de extremo de la almohadilla 11 de goteo de muestra en el lado corriente abajo en la dirección de desarrollo están dispuestas de tal manera que estén en contacto. Como un resultado, se forma una interfaz d4.

La configuración que realiza la segunda función de acuerdo con la presente realización consiste en proporcionar la porción 13a no contenedora más lejana corriente arriba de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora además de conectar la superficie de extremo de la almohadilla 11 de goteo de muestra en el lado corriente abajo a la superficie de extremo de la porción 13a no contenedora en el lado corriente arriba. De este modo, dado que la sustancia marcadora no se retiene en la ubicación donde fluye la muestra líquida, el kit de prueba 1B puede inhibir la retención de la sustancia marcadora producida por quedar atrapada en una perturbación del flujo de la muestra líquida. Además, dado que la superficie de extremo de la porción 13a no contenedora y la superficie de extremo de la almohadilla 11 de goteo de muestra están conectadas mientras están adyacentes mutuamente, el kit de prueba 1B puede disminuir el área de la interfaz d4 en comparación con el caso de disponer la almohadilla 11 de goteo de líquido superpuesta sobre la porción 13a no contenedora, y dado que el volumen de flujo de la muestra líquida puede disminuirse sin ser afectado por la gravedad, se suprimen las perturbaciones en el flujo de la muestra líquida y se puede inhibir además la retención de la sustancia marcadora.

En la descripción mencionada anteriormente, la superficie de extremo de la almohadilla 13 de retención de sustancia marcadora en el lado corriente arriba y la superficie de extremo de la almohadilla 11 de goteo de muestra en el lado corriente abajo se conectaron mientras que se formaban respectivamente con miembros separados. Sin embargo, la región de retención de sustancia marcadora y la región de goteo también pueden formarse integralmente con un único miembro. Lo siguiente proporciona una explicación detallada del mismo.

La figura 8 es una vista lateral que muestra una variación de acuerdo con la presente realización. La figura 9 es una vista superior que muestra una primera almohadilla 17 de la figura 8.

Un cuerpo 10Ba de kit tiene una región en desarrollo en la forma de la membrana 15 inmovilizadora y una primera almohadilla 17. La primera almohadilla 17 es una almohadilla en la cual una región 171 de goteo que tiene una absorbencia prescrita y una región 172 de retención de sustancia marcadora que tiene absorción más alta que la región 171 de goteo están formadas integralmente por un único miembro. La región 172 de retención de sustancia marcadora tiene una porción 172a no contenedora que no contiene una sustancia marcadora, y una porción 172b contenedora en la cual está contenida una sustancia marcadora. Aunque la porción 172b contenedora retiene, por ejemplo, la sustancia marcadora de manera uniforme, no está limitada a la misma. La primera almohadilla 17 puede formarse al presionar solo la región 172 de retención de sustancia marcadora de tal manera que la absorbencia de la región 172 de retención de sustancia marcadora sea mayor que la de la región 171 de goteo. Más específicamente, por ejemplo, la primera almohadilla 17 puede formarse integralmente mediante calentamiento por compresión y similares de tal manera que la absorbencia de la región 172 de retención de sustancia marcadora sea mayor que la de la región 171 de goteo, o puede formarse al laminar integralmente fibras de diferentes materiales mediante unión por fusión térmica y similares de tal manera que la absorbencia de la región 172 de retención de sustancia marcadora sea más alta que la de la región 171 de goteo de muestra.

El kit de prueba 1Ba puede facilitar el ensamblaje al formar integralmente la región de goteo y la región de retención de sustancia marcadora que tiene diferentes absorbencias de la primera almohadilla 17 con un único miembro.

La figura 10 es un dibujo para explicar cómo una almohadilla de goteo y una almohadilla de retención de sustancia marcadora pueden estar formadas integralmente por un único miembro.

En un kit de prueba 1D, la región de retención de sustancia marcadora se forma al presionar la porción de extremo en el lado corriente abajo en la dirección longitudinal de un material fibroso que tiene aberturas uniformemente gruesas (a saber, absorbencia) en la forma de una primera almohadilla 27 a una presión deseada. Más específicamente, por ejemplo, una porción que sirve como una región de retención de sustancia marcadora de la primera almohadilla 27 se presiona a una presión deseada por el alojamiento en una caja 60. Lo siguiente proporciona una explicación de ello.

La primera almohadilla 27 tiene una porción 27B contenedora que contiene uniformemente una sustancia marcadora. La porción 27B contenedora se forma al impregnar una porción de extremo de la primera almohadilla 27 en la dirección longitudinal con una solución que contiene la sustancia marcadora seguida por secado. Adicionalmente, la sustancia marcadora no se retiene en una región 27A que constituye una región aparte de la porción 27B contenedora de la primera almohadilla 27 (la cual de aquí en adelante también puede denominarse como región 27A no contenedora).

La caja 60 tiene un cuerpo 62 de caja que aloja el kit de prueba 1D y una cubierta 61 que cubre el cuerpo 62 de caja. Por ejemplo, se proporciona una pluralidad de porciones 621 sobresalientes para posicionar el kit 1 de prueba que se eleva desde el cuerpo 62 de caja. Una abertura 611 para que gotee una muestra líquida sobre la región 171 de goteo de muestra y una abertura 612 para visualizar una línea de prueba en la membrana 15 inmovilizadora se forman en la cubierta 61. Una porción 613A de presión para formar la región de retención de sustancia marcadora en la primera almohadilla 27 se forma en la cubierta 61. La porción 613A de presión se proporciona en una ubicación que se opone a la porción de extremo en el lado corriente abajo de la primera almohadilla 27 (y más específicamente, la porción 27B contenedora y una porción en el lado corriente abajo de la porción 27A no contenedora), con el kit de prueba 1D alojado en la caja 60. De este modo, en el caso de que el kit de prueba 1D que tiene la primera almohadilla 27 esté alojado en el cuerpo 62 de caja, las fibras de la porción de extremo en el lado corriente abajo de la primera almohadilla 27 se trituran por la porción 613A de presión, permitiendo de esa manera la formación de una diferencia en la absorbencia de la primera almohadilla 27, y dando como resultado la formación de una región de goteo de muestra y una región de retención de sustancia marcadora que tiene una absorbencia más alta que la región de goteo de muestra.

Como un resultado de proporcionar la porción 613A de presión en la caja 60, la producción se puede simplificar sin tener que procesar la primera almohadilla 27 antes de incorporarla en la caja 60. Adicionalmente, también se puede proporcionar una proyección 614 en la cubierta 61 para presionar el lado corriente abajo de la membrana 15 inmovilizadora (por ejemplo, en las cercanías de la interfaz d2 entre la almohadilla 20 absorbente y la membrana 15 inmovilizadora más lejana corriente abajo de la ubicación de la línea de prueba). Como un resultado, las fibras en el lado corriente abajo de la membrana 15 inmovilizadora se trituran y la muestra líquida puede fluir suavemente.

Además, aunque la porción 613A de presión se formó en la cubierta 61 de la caja 60 en la descripción mencionada anteriormente, no está limitada a la misma. Por ejemplo, se puede formar una porción de presión que sobresale de la parte inferior del cuerpo 62 de caja. Además, se pueden usar miembros de restricción y similares que usan una fuerza de presión prescrita para restringir la porción de extremo en el lado corriente abajo de la primera almohadilla 27 desde arriba y abajo en vez de usar la caja 60.

La figura 11 es un dibujo para explicar otra variación de cómo una almohadilla de goteo y una almohadilla de retención de sustancia marcadora pueden formarse integralmente por un único miembro.

Se usa un material fibroso que tiene aberturas uniformemente gruesas (a saber, absorbencia) en la forma de una primera almohadilla 27 y una caja 60. La porción que sirve como una región de retención de sustancia marcadora de la primera almohadilla 27 se presiona a una presión deseada, por ejemplo, al ser alojada en la caja 60.

Una porción 613B de presión se forma en una cubierta. La ubicación de la parte 613B de presión se establece en una ubicación que se opone a la porción de extremo en el lado corriente abajo de la primera almohadilla 27 (y más específicamente, solo la porción 27B contenedora) con el kit de prueba 1D alojado en la caja 60. De este modo, en el caso de que el kit de prueba 1D que tiene la primera almohadilla 27 se haya alojado en el cuerpo 62 de caja, las fibras de la porción de extremo en el lado corriente abajo de la primera almohadilla 27 son trituradas por la porción 613B de presión, se puede formar una diferencia en absorbencia en la primera almohadilla 27, y se forman una región de goteo de muestra y una región de retención de sustancia marcadora, que tiene absorbencia más alta que la región de goteo de muestra.

En la realización mencionada anteriormente, la producción se puede simplificar sin tener que procesar la primera almohadilla 27 antes de incorporarla a la caja 60 al proporcionar la porción 613B de presión en la caja 60.

Además, aunque la porción 613B de presión se formó en la cubierta 61 de la caja 60 en la descripción mencionada anteriormente, no está limitada a la misma. Por ejemplo, la porción de presión también puede formarse sobresaliendo de la parte inferior del cuerpo 62 de caja. Además, se pueden usar miembros de restricción y similares que usan una fuerza de presión prescrita para restringir la porción de extremo en el lado corriente abajo de la primera almohadilla 27 desde arriba y abajo en vez de usar la caja 60.

Aunque la descripción precedente ha proporcionado una explicación de varias realizaciones de la presente invención, estas realizaciones se proporcionan como ejemplos para explicar la presente invención, y no pretende limitar el alcance de la presente invención a solo estas realizaciones. La presente invención también se puede llevar a cabo en diversas otras formas.

5

La invención en su forma más amplia está definida por la reivindicación independiente 1.

A continuación, se proporciona una explicación de experimentos comparativos entre el kit de prueba de acuerdo con la presente invención y un kit de prueba de la técnica anterior como ejemplo 1.

10

[Ejemplo 1]

Lo siguiente proporciona una explicación de dos experimentos. Adicionalmente, se usó un kit de prueba para detectar el virus de influenza A tipo (sustancia que va a ser detectada) en los experimentos. Además, se usaron partículas de poliestireno fluorescente para las partículas portadoras insolubles que sirven como un marcador.

15

<<Primer experimento >>

El primer experimento fue un experimento para comparar la velocidad de desarrollo de una sustancia marcadora entre un kit de prueba de acuerdo con la primera realización y un kit de prueba de la técnica anterior. Más específicamente, se evaluó la presencia o ausencia de una sustancia marcadora restante cerca de la ubicación de una línea de prueba (la cual de aquí en adelante también puede denominarse como antecedente) a intervalos de tiempo prescritos después de que gotea una muestra líquida. En explicaciones subsecuentes de los experimentos, el kit de prueba de la técnica anterior se explica cómo Kit de Prueba A, mientras que el kit de prueba de acuerdo con la primera realización se explica cómo Kit de Prueba B. Además, la cantidad de tiempo tomado para evaluar la presencia o ausencia de sustancia marcadora restante en el antecedente se denomina como tiempo de evaluación de antecedente. Lo siguiente proporciona una explicación secuencial del mismo.

20

25

<Preparación de anticuerpo>

30

La preparación de anticuerpo se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento indicado a continuación.

(* Los ratones BALB/c se inmunizaron con antígeno de virus de influenza A tipo, y se extrajeron los bazo de los ratones después de alojar a los animales durante un período fijo de tiempo seguido por fusión con células de mieloma de ratón para formar células fusionadas (hibridomas).

35

(* Después de mantener las células fusionadas (hibridomas) a una temperatura prescrita, las células se purificaron (monoclonadas) mientras que se confirmaba la actividad de anticuerpos del sobrenadante mediante ELISA usando una placa inmovilizada con el antígeno NP de virus de influenza A tipo.

40

(* Dos líneas de las células monoclonales adquiridas se administraron cada una por vía intraperitoneal a ratones BALB/c seguido por la recolección de ascitis que contenía anticuerpos de cada ratón después de un período fijo de tiempo.

45

(* Se purificó IgG de cada uno de los dos tipos resultantes de ascitis para obtener dos tipos de anticuerpos NP de virus de influenza A antitipo purificados.

<Preparación de membrana inmovilizadora>

50

La preparación de membrana inmovilizadora se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento indicado a continuación.

(* El primer anticuerpo NP de virus de influenza A antitipo se diluyó a una concentración prescrita con agua purificada.

(* La solución diluida se recubrió y se secó en la forma de una línea en una ubicación prescrita en una membrana de nitrocelulosa para formar una zona de detección inmovilizada con anticuerpo NP de virus de influenza A antitipo y obtener una membrana inmovilizadora.

55

<Preparación de sustancia marcadora>

60

La preparación de sustancia marcadora se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento indicado a continuación.

(* El segundo anticuerpo NP de virus de influenza A antitipo se diluyó a una concentración prescrita con agua purificada seguido por la adición de partículas de poliestireno fluorescentes a la solución diluida y con agitación.

(*) Se añadió además un agente de entrecruzamiento y se agitó seguido por la eliminación del sobrenadante mediante centrifugación para obtener una sustancia marcadora (partículas de poliestireno fluorescente unidas al anticuerpo NP de virus de influenza A tipo).

5 <Preparación de almohadilla de retención de sustancia marcadora>

La preparación de la almohadilla de retención de sustancia marcadora fue como se describe a continuación.

10 La sustancia marcadora se recubrió sobre almohadillas (tela no tejida de fibra de vidrio) a 2.0, 1.5, 1.2, 0.8 o 0.4 µg cada una seguido por secado. Más específicamente, las almohadillas (A) de retención de sustancia marcadora de la técnica anterior, en las cuales cada sustancia marcadora estaba recubierta de manera uniforme, y las almohadillas (B) de retención de sustancia marcadora de acuerdo con la primera realización, las cuales tenían una porción no contenedora, se prepararon para cada una de las almohadillas mencionadas anteriormente que contenían cinco tipos de cantidades de partículas, respectivamente (2.0, 1.5, 1.2, 0.8 o 0.4 µg).

15 <Ensamblaje de kits de prueba>

El ensamblaje de los kits de prueba fue como se describe a continuación.

20 Se dispuso un cuerpo de kit (membrana inmovilizadora, almohadilla de retención de sustancia marcadora y almohadilla de goteo de muestra) y una almohadilla absorbente en la superficie superior de una lámina adhesiva. La disposición del Kit de Prueba A de la técnica anterior fue como se muestra en la figura 11 (indicado como kit de prueba a en el dibujo). La disposición de Kit de Prueba B de la primera realización fue como se muestra en las figuras 1 y 2 (kit de prueba 1A en los dibujos).

25 <Preparación de muestra líquida>

La muestra líquida se preparó bajo condiciones prescritas.

30 <Medición de antecedente>

La medición de antecedente se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento indicado a continuación.

35 (*) 50 µl de muestra líquida gotearon sobre la almohadilla de goteo seguido por la observación de la forma en la cual se desarrolla la sustancia marcadora en cada kit de prueba. La sustancia marcadora se observó visualmente en la membrana inmovilizadora.

(*) Se hicieron observaciones a intervalos de un minuto.

40 (*) Además, se hicieron observaciones en un transiluminador para asegurar la precisión. Los casos en los cuales la sustancia marcadora permanecía claramente fueron evaluados como antecedente (+), mientras que los casos en los cuales apenas era visible fueron evaluados como antecedente (-).

45 <Resultados>

Los resultados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Recubrimiento	Cant. de partículas	Tiempo de Evaluación de Antecedente (min)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Kit de Prueba A (técnica anterior)	2 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
	1.5 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	1.2 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	0.8 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	0.4 µg	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Kit de Prueba B	2 µg	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1.5 µg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1.2 µg	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	0.8 µg	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	0.4 µg	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

La cantidad de partículas retenidas en la almohadilla de retención de sustancia marcadora de Kit de Prueba B se evaluó como antecedente (-) en un período más corto de tiempo en comparación con Kit de Prueba A en todos los casos. En otras palabras, se determinó a partir del presente experimento que el Kit de Prueba B permite que la sustancia marcadora se desarrolle más rápidamente que el Kit de Prueba A independientemente de la cantidad de sustancia marcadora retenida en la almohadilla de retención de sustancia marcadora. Desde una perspectiva diferente, se determinó que el Kit de Prueba B permitía la carga de una cantidad mayor de la sustancia marcadora que el Kit de Prueba A en el tiempo de evaluación comparativamente corto de 8 a 10 minutos después del goteo.

<<Segundo experimento>>

Se determinó a partir del primer experimento que el Kit de Prueba B permite que una muestra líquida que contiene una sustancia marcadora se desarrolle más rápidamente que el Kit de Prueba A. Sin embargo, aun si el desarrollo es rápido, no se puede hacer una evaluación precisa a menos que haya una sensibilidad favorable. El segundo experimento fue un experimento para comparar la sensibilidad de sustancia marcadora de un kit de prueba de acuerdo con la primera realización y un kit de prueba de la técnica anterior. Lo siguiente proporciona una explicación secuencial del mismo.

<Preparación de muestra líquida (que contiene una sustancia que va a ser detectada)>

La preparación de la muestra líquida (que contenía una sustancia que iba a ser detectada) fue como se describe a continuación.

Se usó una solución de la sustancia que iba a ser detectada (antígeno NP de virus de influenza A tipo) para el líquido sin diluir, y se prepararon siete tipos de muestras líquidas (que contenían la sustancia que iba a ser detectada) haciendo diluciones en serie de dos veces (2¹, 2², 2³, 2⁴, 2⁵, 2⁶ y 2⁷).

<Medición>

La medición se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento indicado a continuación.

(*) 50 µL de alícuotas de los siete tipos mencionados anteriormente de muestras líquidas (que contenían la sustancia que iba a ser detectada) gotearon en el Kit de Prueba A y Kit de Prueba B, y se hizo una determinación en cuanto a si la línea de prueba puede o no ser identificada visualmente después de que ha transcurrido un tiempo de medición.

(*) El tiempo de medición fue 8 minutos.

(*) En el segundo experimento, se evaluaron los siguientes kits de prueba en los cuales se evaluó el antecedente como (-) en un tiempo de medición de 8 minutos en el primer experimento. En otras palabras, se suponía que un tiempo de 8 minutos era el tiempo de medición para llevar a cabo prueba rápida, y aquellos kits de prueba para los cuales el tiempo de medición en el cual se evaluó el antecedente como (-) en el primer experimento fue de 8 minutos o más se excluyeron de la evaluación.

ES 2 752 466 T3

- Kit de Prueba A (cantidad de partículas: 0.4 µg)
- Kit de Prueba B (cantidad de partículas: 0.8 µg y 1.5 µg)

5 (*) Además, se hicieron observaciones en un transiluminador para asegurar la precisión. Los casos en los cuales el marcado de la línea de prueba se pudo identificar visualmente se evaluaron como línea de prueba (+), mientras que los casos en los cuales no se pudo identificar el marcado de la línea de prueba se evaluaron como línea de prueba (-).

10 <Resultados>

Los resultados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

15

Recubrimiento	Cant. de Partículas	Prueba de Sensibilidad Tipo A de Gripe						
		Dilución en Serie						
		2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷
Kit de Prueba A	0.4 µg	+	+	+	+	-	-	-
Kit de Prueba B	1.5 µg	+	+	+	+	+	+	-
	0.8 µg	+	+	+	+	+	-	-

20

La evaluación mencionada anteriormente consistió en evaluar la línea de prueba 8 minutos después de que goteará la muestra líquida (que contenía la sustancia que iba a ser detectada) en cada kit de prueba. El factor de dilución de muestras líquidas (que contenía la sustancia que iba a ser detectada) que la sustancia evaluó como línea de prueba (+) fue mayor para el Kit de Prueba B en comparación con el Kit de Prueba A. En el Kit de Prueba B que tenía una almohadilla de retención de sustancia marcadora en la cual la cantidad de partículas fue 1.5 µg en particular, el marcado de la línea de prueba se pudo identificar incluso cuando se usó una muestra líquida (que contenía la sustancia que iba a ser detectada) que tenía un factor de dilución alto de 2⁶. En otras palabras, en el presente experimento, se determinó que el Kit de Prueba B tenía alta sensibilidad en comparación con el Kit de Prueba A en el tiempo comparativamente corto después del goteo de 8 minutos.

25

De acuerdo con el primer y segundo experimentos mencionados anteriormente, el Kit de Prueba B se determinó para permitir la detección de una sustancia para ser detectada tanto más rápido como con mayor sensibilidad en comparación con el Kit de Prueba A.

30

[Lista de signos de referencia]

1A Kit de Prueba

35

10A Cuerpo de kit

11 Almohadilla de goteo de muestra

40

13 Almohadilla de retención de sustancia marcadora

13a Porción no contenedora

13b Porción contenedora

45

15 Membrana inmovilizadora

20 Almohadilla absorbente

50

30 Lámina

REIVINDICACIONES

1. Un kit (1A, 1B) de prueba para detectar una sustancia que va a ser detectada contenida en una muestra líquida permitiendo que la muestra líquida se desarrolle en una dirección de desarrollo, comprendiendo el kit de prueba:
- 5 una almohadilla (11, 171) de goteo, la cual contiene una porción sobre la cual gotea la muestra líquida;
- una almohadilla (13, 172) de retención de sustancia marcadora, la cual está dispuesta corriente abajo de la almohadilla (11, 171) de goteo en la dirección de desarrollo de tal manera que al menos una porción de la almohadilla (13, 172) de retención de sustancia marcadora está en contacto con la almohadilla (11, 171) de goteo, y en la cual se retiene una sustancia marcadora con un marcador inmovilizado en una sustancia que se une específicamente con la sustancia que va a ser detectada; y
- 10 una región (15) en desarrollo, la cual tiene una zona de detección donde la sustancia marcadora se captura a través de la sustancia que va a ser detectada, en donde la región (15) en desarrollo está dispuesta corriente abajo de la almohadilla (13, 172) de retención de sustancia marcadora en la dirección de desarrollo, de tal manera que al menos una porción de la región (13, 172) en desarrollo está en contacto con la almohadilla (11, 171) de retención de sustancia marcadora y la cual permite que la sustancia marcadora se haya hecho fluir desde la almohadilla (13, 172) de retención de sustancia marcadora por la muestra líquida, para desarrollarse en la zona de detección, en donde el kit de prueba
- 15 (1A, 1B) se caracteriza porque
- la absorbencia de la almohadilla (13, 172) de retención de sustancia marcadora se establece más alta que la absorbencia de la almohadilla (11, 171) de goteo, y
- 20 una porción (13a) no contenedora que no contiene la sustancia marcadora se proporciona en una porción más lejana corriente arriba de la almohadilla (13, 172) de retención de sustancia marcadora.
- 25

Fig. 1

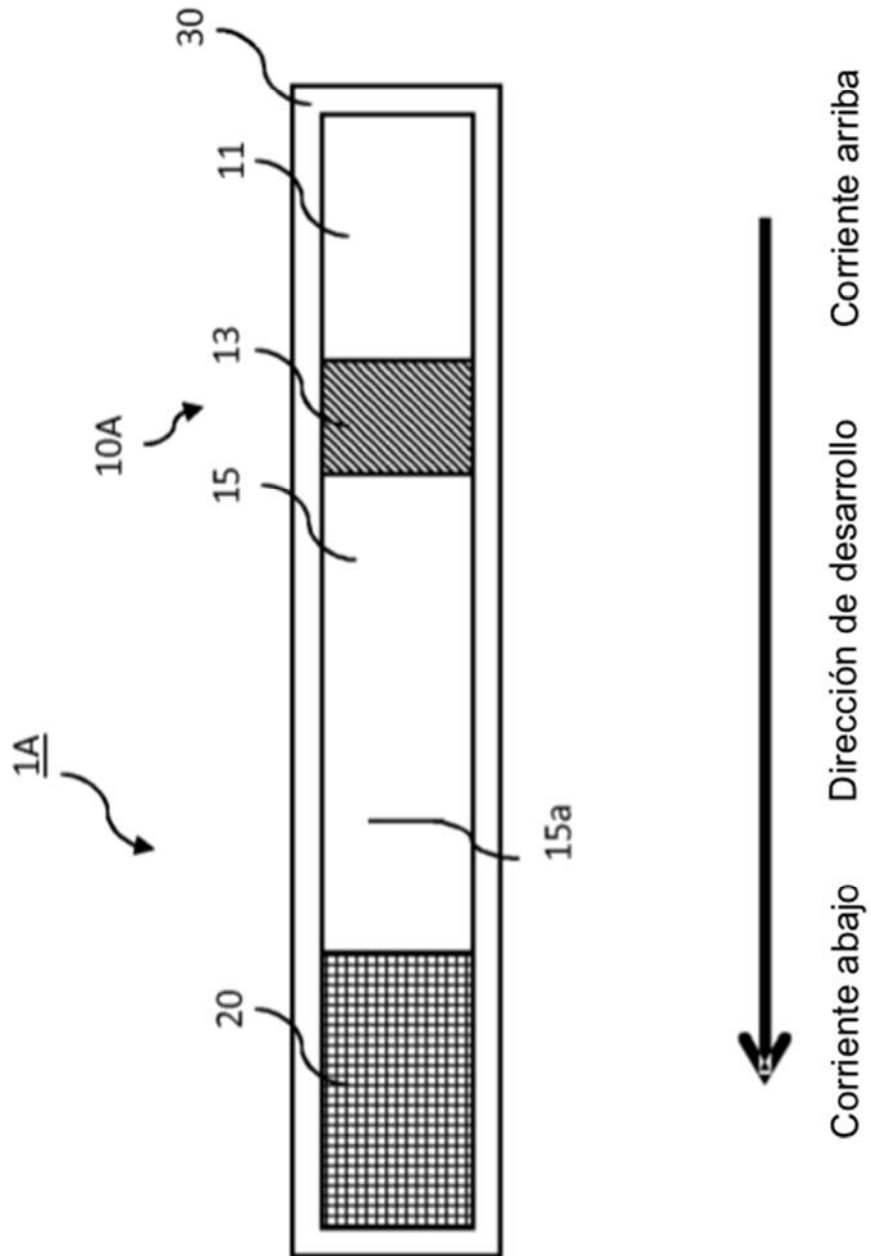


Fig. 2

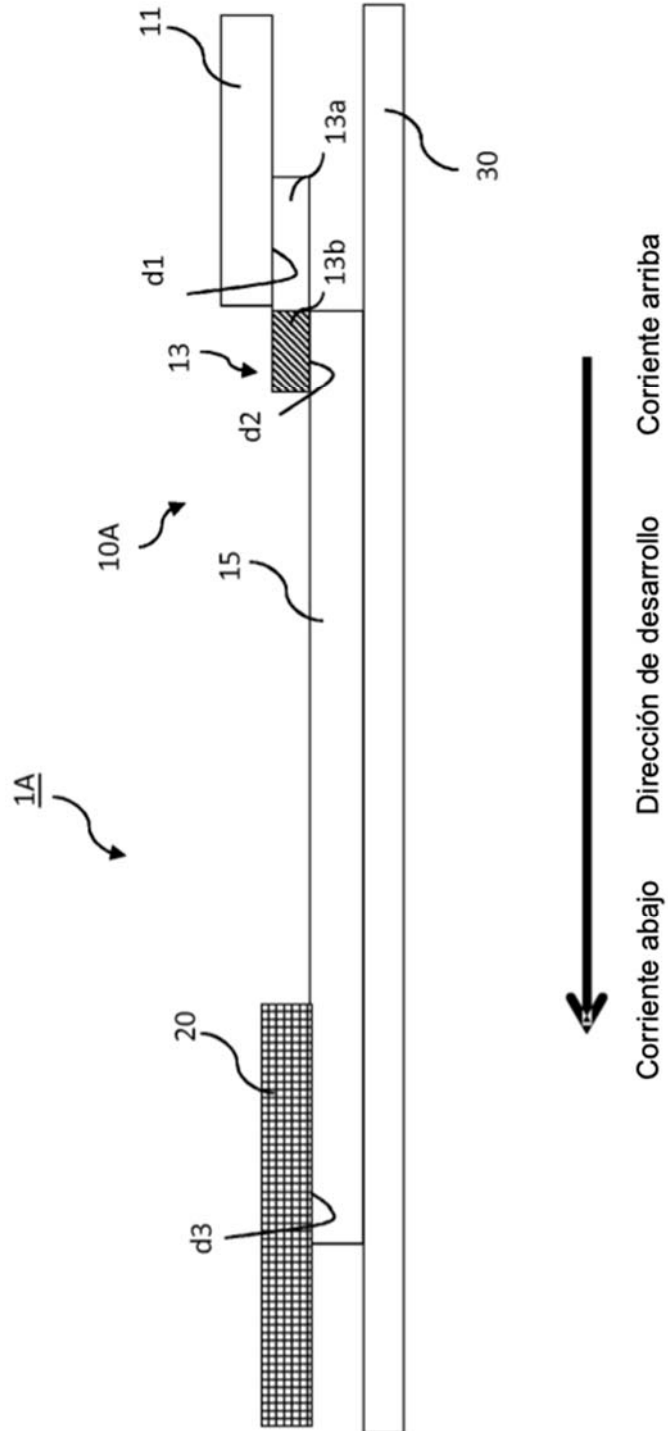


Fig. 3

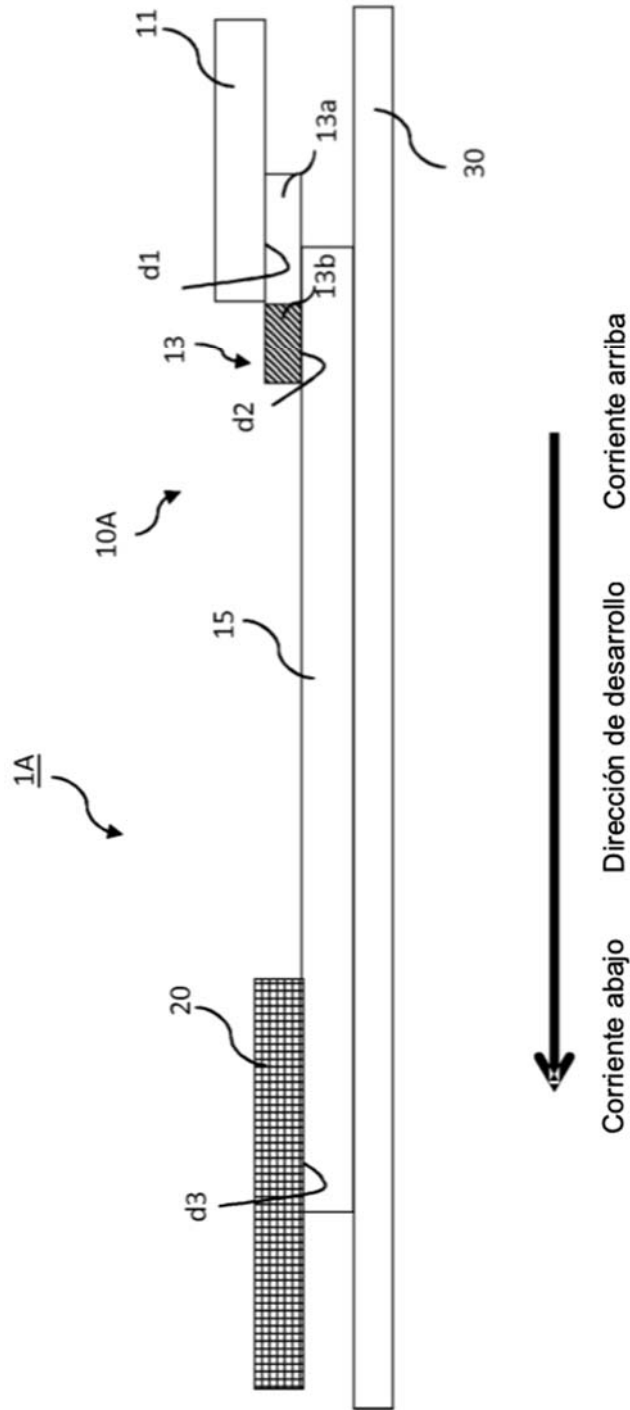


Fig. 4

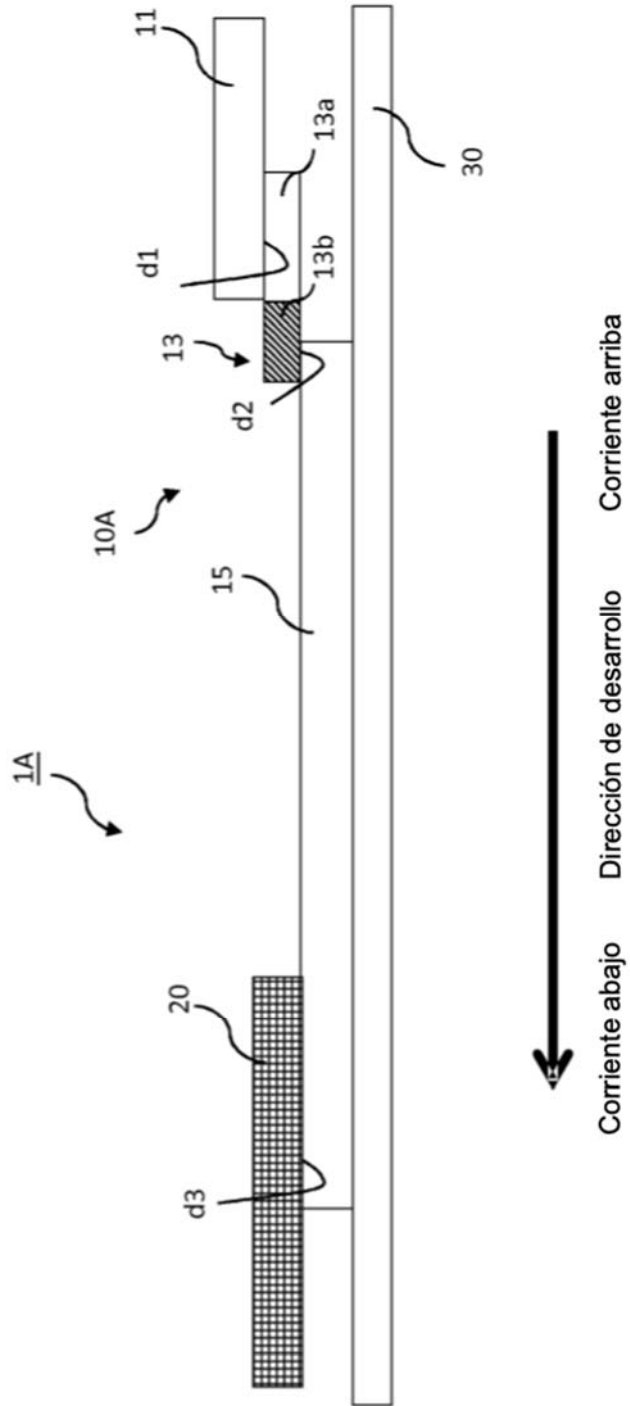


Fig. 5

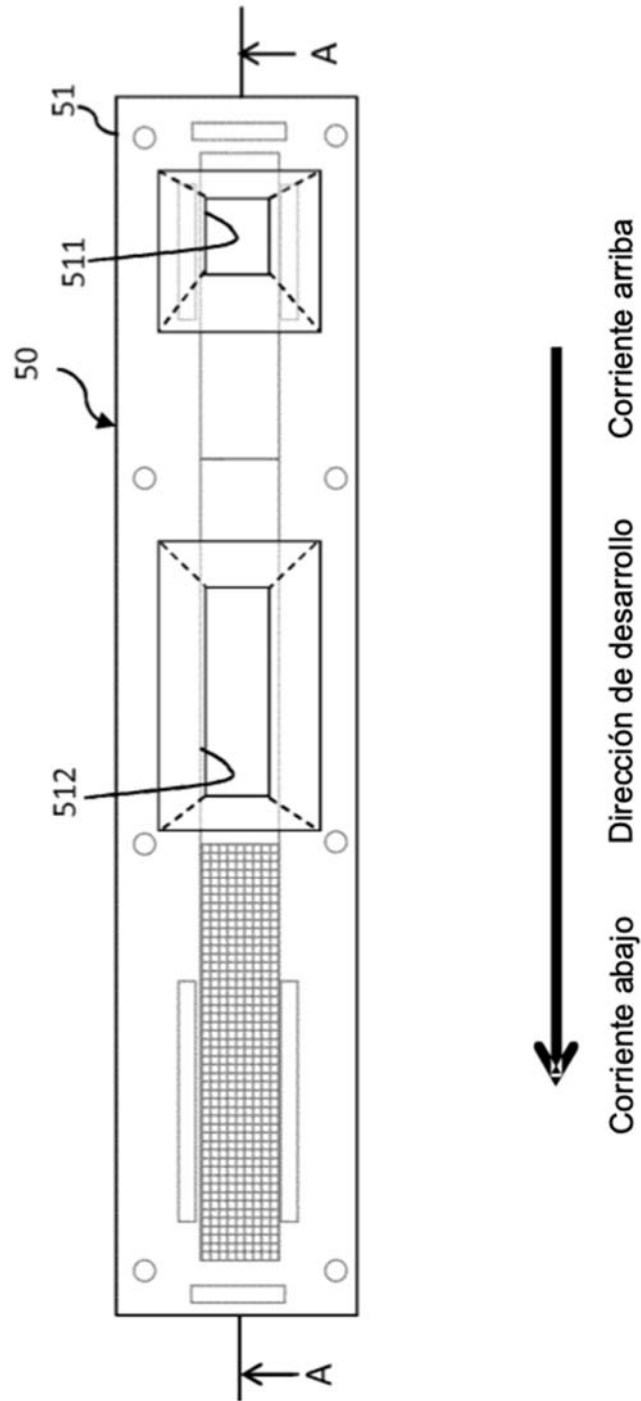


Fig. 7

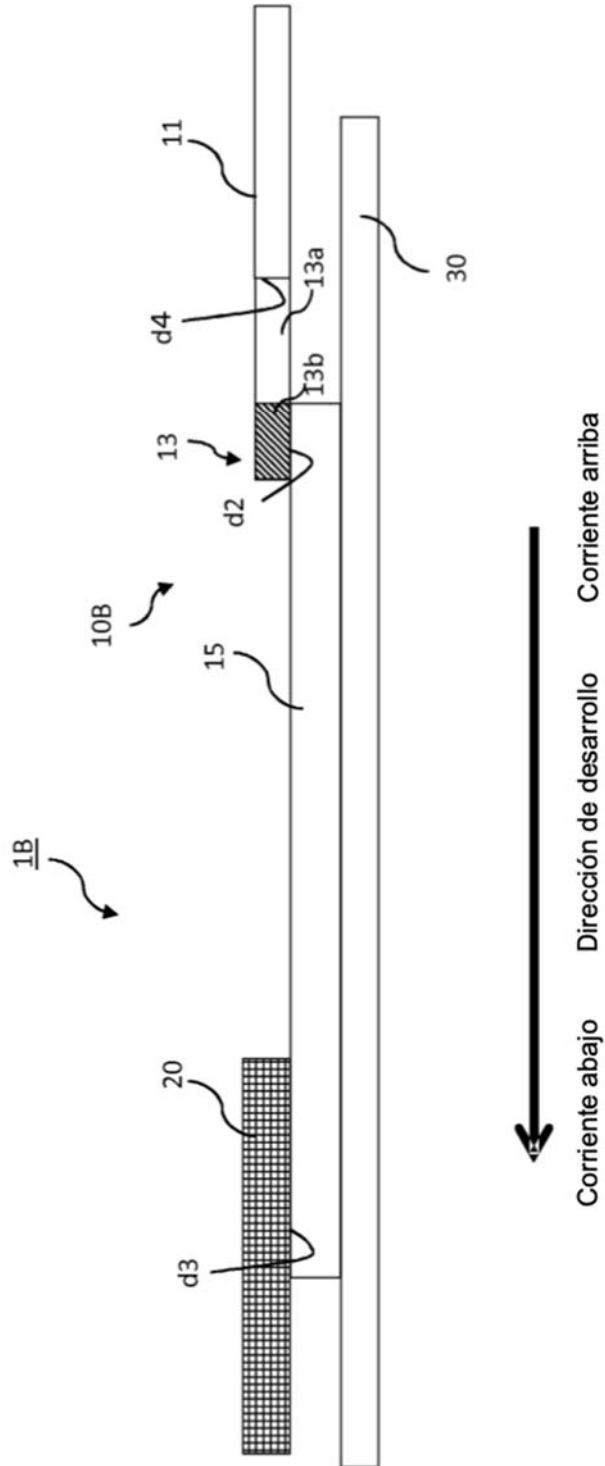


Fig. 8

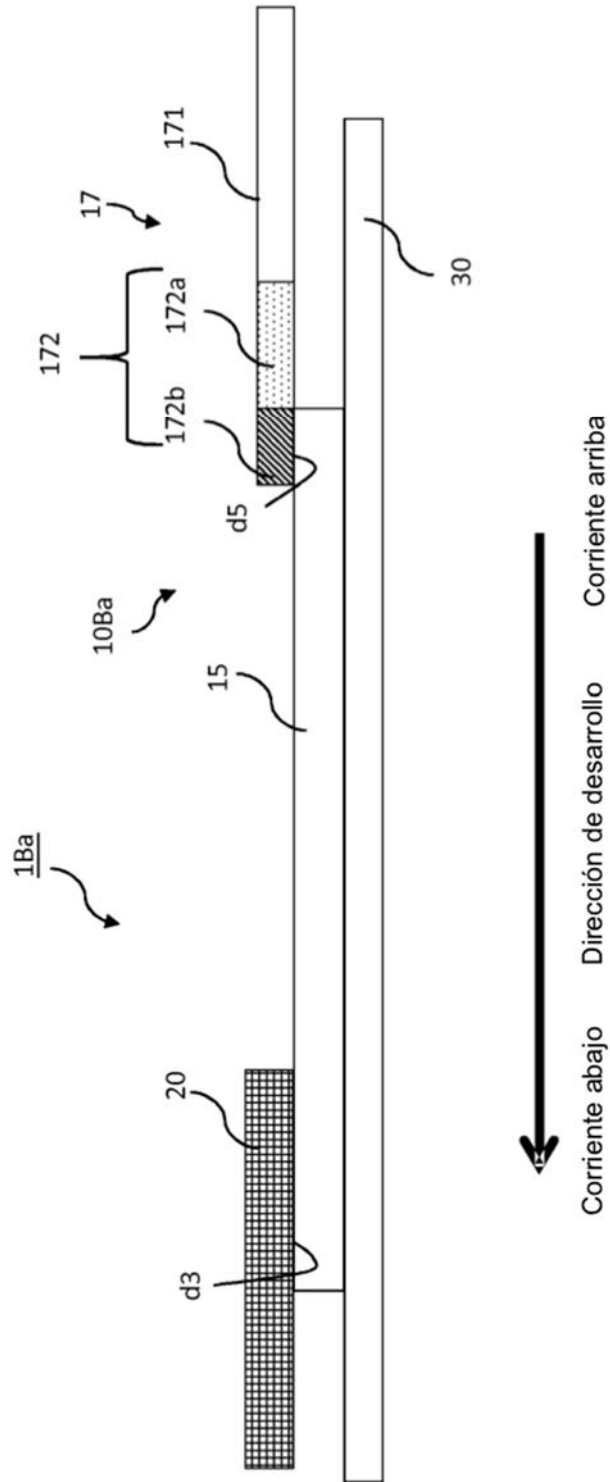


Fig. 9

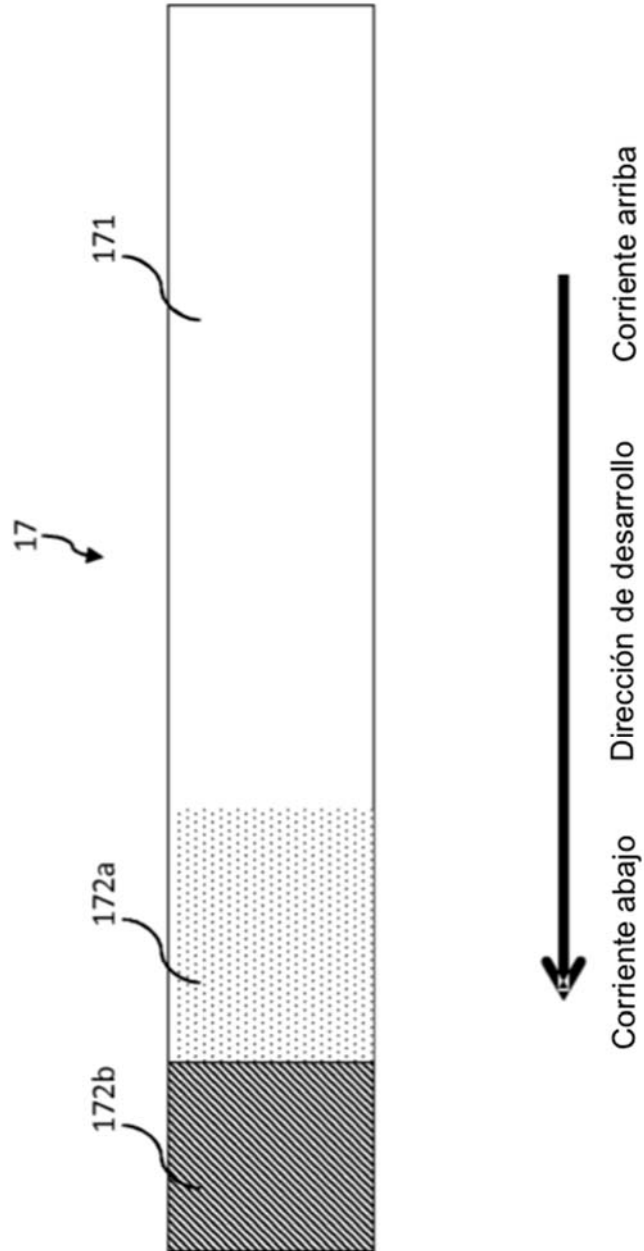


Fig. 10

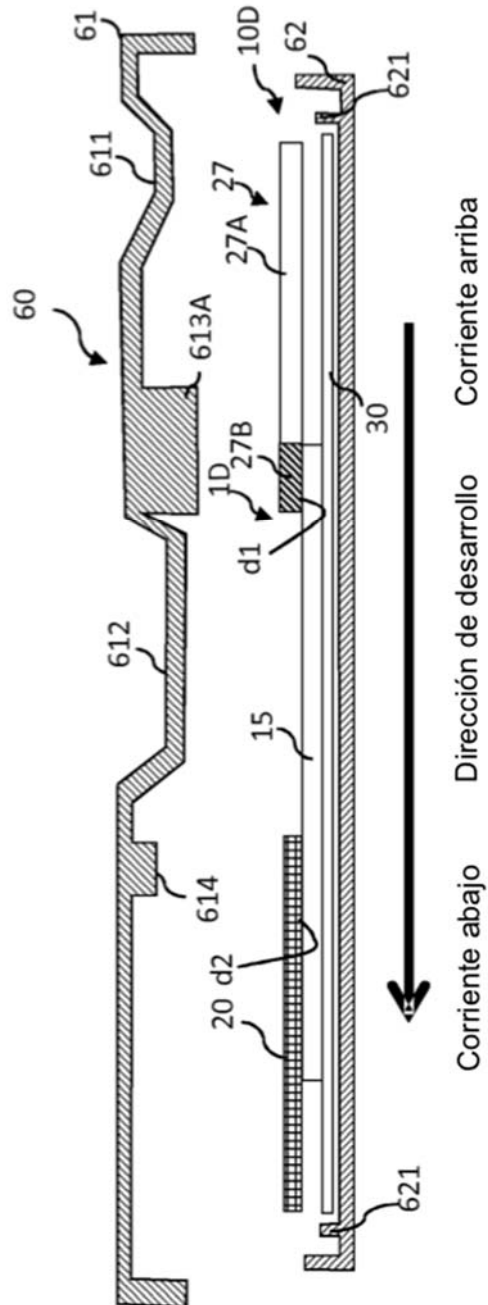


Fig. 11

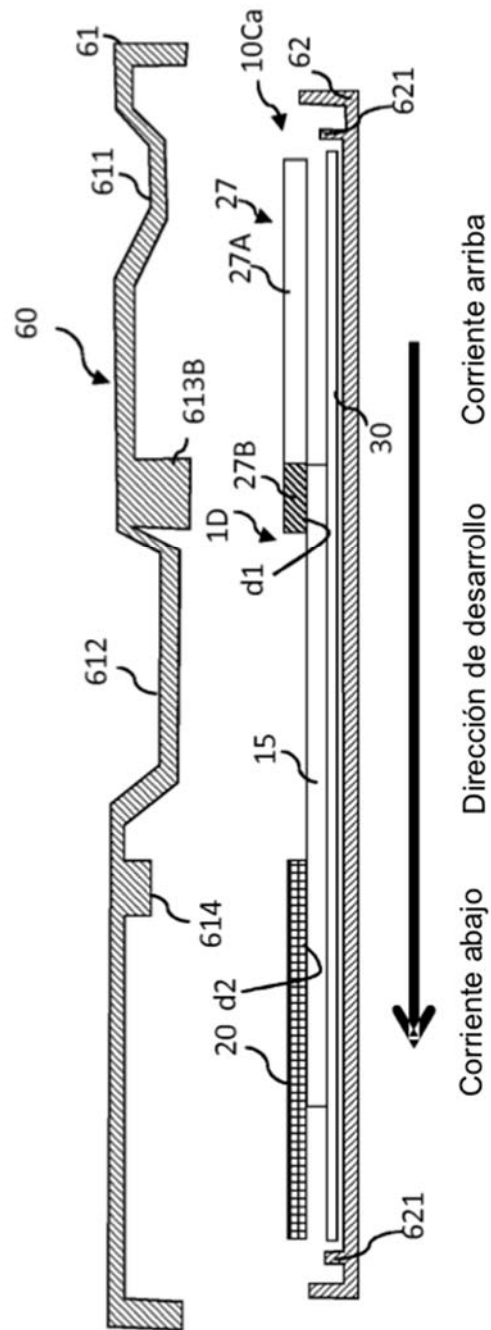


Fig. 12

