



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 547**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C12Q 1/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04749731 .8**  
96 Fecha de presentación : **02.04.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1618377**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Sustrato cromogénico con un colorante indicador de pH.**

30 Prioridad: **29.04.2003 US 426169**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.11.2011**

73 Titular/es: **NEOGEN CORPORATION**  
**620 Leshar Place**  
**Lansing, Michigan 48912, US**

72 Inventor/es: **Mayer, Brent, A.**

74 Agente: **Miltényi Null, Peter**

ES 2 367 547 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

Sustrato cromogénico con un colorante indicador de pH

(1) Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una composición para un ensayo ligado a enzimas que comprende un sustrato cromogénico que produce un color detectable con una absorbancia máxima a una longitud de onda en reacciones del ensayo que contienen la enzima y un colorante indicador de pH que produce un color detectable con una absorbancia máxima a una segunda longitud de onda cuando el pH de las reacciones del ensayo se cambia para terminar las reacciones, para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo. El sustrato cromogénico permite la detección colorimétrica de una sustancia con capacidad para unirse en reacciones 10 positivas del ensayo y el colorante indicador de pH permite que las reacciones negativas del ensayo puedan distinguirse colorimétricamente de reacciones falsas negativas. Preferiblemente, se usa la composición en inmunoensayos ligados a enzimas tales como los ELISA. Lo más preferiblemente, la enzima es una peroxidasa. En una realización preferida adicional, el sustrato cromogénico es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y el colorante indicador de pH se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en rojo de cresol y púrpura de m-cresol.

15 (2) Descripción de la técnica relacionada

Los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) son los inmunoensayos utilizados más comúnmente para una gran variedad de aplicaciones en diagnóstico, investigación, pruebas en alimentos, control de calidad y garantía de calidad de procesos, y pruebas medioambientales. Los ELISA utilizan una enzima de marcaje y un sustrato para la enzima para producir una señal detectable para cuantificar antígenos, haptenos o anticuerpos. La 20 sensibilidad de los ELISA depende de la combinación de sustrato y enzima de marcaje particular usada. Se ha encontrado que la peroxidasa de rábano (HRP) es muy adecuada para su uso como una enzima de marcaje en los ELISA porque es altamente específica, sensible y muy estable en la catalización de reacciones cromogénicas, de luminiscencia y de fluorescencia.

25 Para aumentar la sensibilidad de los ELISA ligados a peroxidasa, se usan sustratos cromogénicos incoloros o ligeramente incoloros. Estos sustratos cromogénicos incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), diclorhidrato de orto-fenilendiamina (OPD), y sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). El documento WO 93/25905 da a conocer un método de inmunoensayo que utiliza un indicador de pH para evaluar si se añadió una muestra a la reacción para evitar resultados falsos negativos. La patente estadounidense n.º 4.503.143 concedida a Gerber *et al.* da a conocer ELISA y otros inmunoensayos que usan TMB como sustrato cromogénico. La patente estadounidense n.º 5.206.150 concedida a Tai da a conocer disoluciones de TMB a base 30 de agua. Los sustratos cromogénicos incoloros reducen la señal de fondo lo que aumenta la sensibilidad total del ensayo. Sin embargo, un problema asociado con el uso de sustratos cromogénicos incoloros es que durante la dispensación de un sustrato incoloro en una pluralidad de tubos o pocillos transparentes de una placa de ELISA, es difícil determinar inmediatamente mediante examen visual si el sustrato cromogénico se añadió a un tubo o pocillo particular o no. Como consecuencia, en algunos casos puede no añadirse el sustrato cromogénico a algunos tubos o pocillos o añadirse dos veces a algunos tubos o pocillos.

Un segundo problema asociado con el uso de sustratos cromogénicos incoloros es determinar si una reacción negativa es negativa porque la muestra para la reacción no contenía el analito que está sometiéndose a prueba o es 40 negativa porque se omitieron uno o más reactivos necesarios para la reacción, por ejemplo el sustrato cromogénico incoloro. El segundo problema es particularmente grave en los ELISA ligados a peroxidasa que incluyen una parada con ácido tras la oxidación del sustrato cromogénico. Dado que no es posible distinguir estos falsos negativos debido a una parada con ácido o muestra omitida de negativos reales debido a la ausencia del analito en la muestra u otros falsos negativos provocados por algunos otros fallos en la reacción tales como muestra omitida o analito degradado en una muestra, el número de reacciones negativas en un ensayo se eleva artificialmente.

45 Se dio a conocer una solución al primer problema en la patente estadounidense n.º 6.221.624 B1 concedida a Lihme y Wikborg que describe una composición previamente teñida que comprende TMB y un colorante visible tal como floxina B, púrpura de m-cresol, o similares. El colorante se usa a una concentración que imparte un color a una disolución que contiene la composición que es visible a simple vista. La disolución coloreada permite al usuario determinar visualmente que el sustrato cromogénico está o se ha añadido a un tubo o pocillo de una placa de ELISA 50 durante el pipeteo. El colorante se selecciona preferiblemente para que no tenga absorbancia en el intervalo de absorbancia en las condiciones a las que debe detectarse el producto de reacción de la reacción entre el sustrato cromogénico y la enzima y que no tenga sustancialmente ninguna influencia sobre la reacción enzima-sustrato cromogénico. El colorante preferido es floxina B que se usa a una concentración que proporciona un visible cuando se añade a una reacción de peroxidasa. La mayoría de inmunoensayos a base de peroxidasa usan una parada con ácido para terminar las reacciones de peroxidasa porque la parada con ácido estabiliza el producto oxidado aumentando así la sensibilidad del ensayo. La floxina B se vuelve incolora cuando se añade una parada con ácido a la reacción. Por tanto, la composición anterior que comprende floxina B o colorantes similares no permite al usuario, después de completarse las reacciones, determinar si una reacción negativa es un negativo real provocado por una ausencia de analito en la muestra o un falso negativo provocado por una omisión de la composición cromogénica. 55

El segundo problema no se ha tratado. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de un método que permita distinguir las reacciones negativas reales (ausencia de analito en la muestra) de falsos negativos provocados por omisión de reactivos de reacción particulares en inmunoensayos ligados a peroxidasa tales como los ELISA al tiempo que no interfiera con reacciones positivas.

## 5 SUMARIO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención se define en las reivindicaciones. A continuación en el presente documento se describen realizaciones preferidas adicionales.

Se proporciona una composición que comprende un sustrato cromogénico con una absorbancia a una longitud de onda y un colorante indicador de pH con una absorbancia a una segunda longitud de onda. La composición permite tanto la detección de una sustancia con capacidad para unirse como la confirmación de reacciones negativas reales en ensayos ligados a enzimas, particularmente inmunoensayos ligados a enzimas tales como los ELISA. En particular, el sustrato cromogénico permite la detección colorimétrica de la sustancia con capacidad para unirse en reacciones positivas del ensayo y el colorante indicador de pH permite distinguir colorimétricamente reacciones negativas reales de los usos de una composición tal como para el uso en (inmuno)ensayos ligados a enzimas, preferiblemente en un ensayo de inmunoabsorción (ELISA) y para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende en una mezcla:

- (a) un sustrato cromogénico que es oxidable por un peróxido generado en el ELISA en una mezcla de reacción a la que se le añade posteriormente una disolución de parada para detener la reacción para formar un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda; y
- (b) un colorante indicador de pH que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que produce un segundo color detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la composición en el recipiente de reacción ensayo de reacciones falsas negativas. Lo siguiente ilustra varias de las realizaciones preferidas de la presente invención.

La presente invención proporciona un método para detectar un analito en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas a base de peroxidasa (ELISA) para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende: (a) proporcionar una composición que comprende una mezcla de un sustrato cromogénico que es oxidable mediante peróxido en una reacción para el ELISA catalizada mediante la peroxidasa del ELISA para formar un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda, un colorante indicador de pH que forma un segundo color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción, y un peróxido; (b) añadir una alícuota de la composición a cada uno de los recipientes de reacción para el ELISA para formar una mezcla de reacción; (c) incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para oxidar el sustrato cromogénico al primer color; (d) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción para detener la reacción y generar el segundo color; y (e) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia sólo a la segunda longitud de onda indica la reacción negativa, y ausencia de absorbancia a la primera y segunda longitudes de onda indica la reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la composición y la disolución de parada.

La presente invención proporciona más aún un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el inmunoensayo para la detección colorimétrica de un analito de un tipo en el que se adsorbe una cantidad de un primer reactivo inmunológico tal como un anticuerpo, fragmento Fab, fragmento Fv, polipéptido Fv de cadena sencilla, u otro derivado de anticuerpo en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un segundo reactivo inmunológico y una peroxidasa; se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el analito, el analito se une al primer reactivo inmunológico y al conjugado para formar un complejo inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del analito midiendo la reacción del complejo inmunológico con un sustrato cromogénico oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, en el que la mejora comprende: (a) proporcionar una disolución líquida que comprende el sustrato cromogénico, peróxido y un colorante indicador de pH, en el que el sustrato cromogénico es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda y el colorante indicador de pH produce un segundo color que es detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida; (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida al sustrato cromogénico; (c) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el primer y segundo colores; y, (d) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa y una ausencia de absorbancia a la primera o segunda longitud de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.

- Se proporciona un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa para la detección colorimétrica de un anticuerpo de un tipo en el que se adsorbe una cantidad de un analito en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un reactivo inmunológico tal como un anticuerpo, fragmento Fab, fragmento Fv, polipéptido Fv de de cadena sencilla, u otro derivado de anticuerpo y una peroxidasa se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el anticuerpo, el anticuerpo se une al analito y al conjugado para formar un complejo inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del anticuerpo midiendo la reacción del complejo inmunológico con un sustrato cromogénico oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, en el que la mejora comprende (a) proporcionar una disolución líquida que comprende el sustrato cromogénico, peróxido y un colorante indicador de pH, en la que el sustrato cromogénico es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda y el colorante indicador de pH produce un segundo color que es detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida; (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida el sustrato cromogénico; (c) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el primer y segundo colores; y, (d) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa y una ausencia de absorbancia a la primera o segunda longitud de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.
- Preferiblemente, en los métodos anteriores, el indicador de pH es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la disolución líquida al recipiente de reacción para el inmunoensayo pero produce el segundo color que es detectable a simple vista y que tiene la absorbancia a la segunda longitud de onda cuando se añade la disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida.
- En una realización adicional de los métodos anteriores, la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN), y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). En una realización adicional, la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico es ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
- En una realización todavía adicional de los métodos anteriores, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol.
- En una realización todavía adicional de los métodos anteriores, la disolución de parada es una base y el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS) y en una realización todavía adicional, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
- En realizaciones adicionales de los métodos anteriores, el ELISA es un inmunoensayo directo, un inmunoensayo indirecto o un inmunoensayo competitivo.
- La presente invención proporciona además un método para detectar un analito usando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato cromogénico en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende (a) proporcionar una composición que comprende una mezcla de TMB que es oxidable mediante peróxido en una reacción para el ELISA catalizada mediante la peroxidasa del ELISA para formar un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda, un colorante indicador de pH que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que forma un segundo color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción, y un peróxido; (b) añadir una alícuota de la composición a cada uno de los recipientes de reacción para el ELISA para formar una mezcla de reacción; (c) incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para oxidar la TMB al primer color; (d) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción para detener la reacción, lo que produce el segundo color y oxida adicionalmente la TMB al primer color; y (e) medir espectrográficamente absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia sólo a la segunda longitud de onda indica la reacción negativa, y ausencia de absorbancia a la primera y segunda longitudes de onda indica la reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la composición y la disolución de parada.
- La presente invención proporciona además usos de un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa para la detección colorimétrica de un analito de un tipo en el que se adsorbe una cantidad de un primer anticuerpo en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un reactivo inmunológico y una peroxidasa; se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el analito, el analito se une al primer anticuerpo y al conjugado para formar un complejo

5 inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del analito midiendo la reacción del complejo inmunológico con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) que es oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, en el que la mejora comprende (a) proporcionar una disolución líquida que comprende la TMB, peróxido, y un colorante indicador de pH, en la que la TMB es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda y el colorante  
 10 indicador de pH es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la disolución líquida al recipiente de reacción para el inmunoensayo pero que produce un segundo color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida; (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida la TMB; (c) añadir  
 15 la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el primer y segundo colores; y, (d) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa y una ausencia de absorbancia a la primera o segunda longitud de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.

La presente invención proporciona además usos de un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa para la detección colorimétrica de un anticuerpo de un tipo en el que se adsorbe una cantidad de un analito en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un reactivo inmunológico tal como un anticuerpo, fragmento Fab, fragmento Fv, polipéptido Fv de cadena sencilla, u  
 20 otro derivado de anticuerpo y una peroxidasa; se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el anticuerpo, el anticuerpo se une al analito y al conjugado para formar un complejo inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del anticuerpo midiendo la reacción del complejo inmunológico con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) que es oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, en el que la mejora comprende (a) proporcionar una disolución líquida que comprende TMB, peróxido y un colorante indicador de pH, en la que la TMB es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda y el colorante  
 25 indicador de pH es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la disolución líquida al recipiente de reacción para el inmunoensayo pero que produce un segundo color que es detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida; (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida la TMB; (c) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el primer y segundo  
 30 colores; y, (d) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa y una ausencia de absorbancia a la primera o segunda longitud de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.

En una realización adicional del método, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, mézopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el  
 40 colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol. En una realización todavía adicional, la primera longitud de onda es de aproximadamente 450 nm y la segunda longitud de onda es superior a 500 nm, y todavía adicionalmente el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

En realizaciones adicionales del método, el ELISA es un inmunoensayo directo, un inmunoensayo indirecto o un inmunoensayo competitivo.

45 La presente invención proporciona además el uso de un kit para detectar un analito en un ensayo ligado a enzimas y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende uno o más primeros recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico, un colorante indicador de pH adecuado para el uso con el sustrato cromogénico, que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la mezcla a un recipiente de reacción para el ensayo ligado a enzimas  
 50 pero que produce un color detectable a simple vista cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la mezcla en el recipiente de reacción, y un peróxido.

La presente invención proporciona además el uso de un kit para un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar un analito y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende uno o más primeros recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico,  
 55 un colorante indicador de pH adecuado para el uso con el sustrato cromogénico, que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la mezcla a un recipiente de reacción para el ELISA pero que produce un color detectable a simple vista cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la mezcla, y un peróxido.

60 En una realización adicional de los kits anteriores, el primer recipiente contiene una mezcla de un sustrato cromogénico y un colorante indicador de pH y el peróxido se contiene en un segundo recipiente. En una realización todavía adicional, el kit incluye además un tercer recipiente que contiene una disolución de parada ácida o básica.

- En realizaciones todavía adicionales de los kits anteriores, el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- 5 En realizaciones todavía adicionales de los kits anteriores, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, rojo de quinaldina, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
- 10 En realizaciones todavía adicionales de los kits anteriores, el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS) y todavía adicionalmente, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
- En realizaciones adicionales de los kits anteriores, el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol y el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
- 15 La presente invención proporciona además el uso de un kit para un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar un analito, para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende uno o más primeros recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) un colorante indicador de pH adecuado para el uso con el sustrato cromogénico, que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la mezcla a un recipiente de reacción para el ELISA pero que produce un color detectable a simple vista cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la mezcla en el recipiente de reacción, y un peróxido. Preferiblemente, el indicador de pH es púrpura de m-cresol.
- 20 En una realización adicional del kit, el primer recipiente contiene una mezcla de la TMB y un colorante indicador de pH y el peróxido se contiene en un segundo recipiente. En una realización adicional, el kit incluye además un tercer recipiente que contiene una disolución de parada ácida o básica.
- 25 La presente invención proporciona además una composición para el uso en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende en una mezcla (a) un sustrato cromogénico que es oxidable mediante un peróxido generado en el ELISA en una mezcla de reacción a la que se le añade posteriormente una disolución de parada para detener la reacción para formar un primer color; y (b) un colorante indicador de pH que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que produce un segundo color detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la composición en el recipiente de reacción.
- 30 En una realización adicional de la composición, el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN).
- 35 En una realización todavía adicional de la composición, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, rojo de quinaldina, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
- 40 En una realización todavía adicional de la composición, el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS) y todavía adicionalmente, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
- En una realización todavía adicional de la composición, el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol y el sustrato cromogénico es ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
- 45 La presente invención proporciona además una composición para el uso en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende en una mezcla acuosa (a) 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) que es oxidable mediante un peróxido generado en el ELISA en una mezcla de reacción a la que se le añade posteriormente una disolución de parada para detener la reacción para formar un primer color; y (b) un colorante indicador que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que produce un color detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la composición en el recipiente de reacción.
- 50 En una realización adicional de la composición, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, rojo de quinaldina, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
- 55

En una realización todavía adicional de la composición, el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para detectar un analito en un ensayo ligado a enzimas y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende (a) proporcionar una composición que comprende una mezcla de un sustrato cromogénico seleccionado del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB) y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN) que se convierte mediante una enzima en un recipiente de reacción para el ensayo a un primer color que tiene una absorbancia a una primera longitud de onda y un colorante indicador de pH que produce un segundo color detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la composición en el recipiente de reacción; (b) añadir una alícuota de la composición a los recipientes de reacción para el ensayo ligado a enzimas para formar una mezcla de reacción; (c) incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el primer color; (d) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción para detener la reacción y generar el segundo color; y (e) medir espectrográficamente absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia sólo a la segunda longitud de onda indica la reacción negativa, y ausencia de absorbancia a la primera y segunda longitudes de onda indica la reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la composición y la disolución de parada.

En una realización adicional del método, la enzima es una fosfatasa alcalina, el sustrato cromogénico es fosfato de p-nitrofenilo, y la disolución de parada es una base. En una realización todavía adicional, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en amarillo de alizarina R, carmín de índigo, rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.

En realizaciones todavía adicionales, el ensayo es un inmunoensayo directo, un inmunoensayo indirecto o un inmunoensayo competitivo. En una realización adicional, el ensayo es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La presente invención proporciona además un uso de un kit para detectar un analito en un ensayo ligado a enzimas y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende uno o más recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico seleccionado del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN) que se convierte mediante una enzima en un recipiente de reacción para el ensayo a un primer color y un colorante indicador de pH adecuado para el uso con el sustrato cromogénico que produce un segundo color detectable a simple vista cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la mezcla en el recipiente de reacción.

En una realización adicional del kit, el sustrato cromogénico es fosfato de p-nitrofenilo. En una realización todavía adicional, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en amarillo de alizarina R, carmín de índigo, rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.

En una realización adicional del kit, el ensayo es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La presente invención proporciona además una composición para el uso en un ensayo ligado a enzimas y que permite distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende en una mezcla (a) un sustrato cromogénico seleccionado del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN) que se convierte mediante una enzima en un recipiente de reacción para el ensayo a un primer color; y (b) un colorante indicador de pH que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que produce un segundo color detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la composición en el recipiente de reacción.

En una realización adicional de la composición, el sustrato cromogénico es fosfato de p-nitrofenilo. En una realización todavía adicional, el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en amarillo de alizarina R, carmín de índigo, rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.

En una realización adicional de la composición, el ensayo es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

## OBJETOS

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para distinguir negativos de falsos negativos en ensayos que no interfiere con reacciones positivas.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para distinguir negativos de falsos negativos en ensayos ligados a peróxido que no interfiere con reacciones positivas.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para distinguir negativos de falsos negativos en ELISA que no interfiere con reacciones positivas.

- 5 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para distinguir negativos de falsos negativos en ELISA ligados a peróxido que no interfiere con reacciones positivas.

Estos y otros objetos de la presente invención resultarán más evidentes con referencia a los siguientes dibujos y realizaciones preferidas.

#### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 La figura 1 muestra espectros de absorbancia comparativos para la composición que comprende TMB y púrpura de m-cresol con y sin peroxidasa de rábano (HRP). La línea negra (-) es el espectro de absorbancia para una muestra que contiene la composición. La línea verde (---) muestra el espectro de absorbancia para una muestra que contiene la composición y la disolución de parada ácida. La línea azul (-x-) muestra el espectro de absorbancia para una muestra que contiene la composición incubada con HRP durante 15 minutos. La línea roja (-|-) muestra el espectro de absorbancia para una muestra que contiene la composición incubada con HRP durante 15 minutos seguido por adición de disolución de parada ácida. Todos los espectros se midieron frente a agua en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 20 La expresión "sustrato cromogénico" incluye compuestos químicos que pueden participar en reacciones enzimáticas particulares o bien como donadores o bien como aceptores para la reacción y que cambian de color durante la reacción. Por ejemplo, peroxidasa convierte peróxido de hidrógeno en agua. Lo hace obteniendo dos hidrógenos de una molécula donadora. Cuando la molécula donadora es un sustrato cromogénico, la oxidación del sustrato cromogénico hace que el sustrato cambie a un color detectable. Por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) es incoloro en el estado reducido pero azul en el estado oxidado o amarillo en el estado de diamina. En el caso de reacciones con fosfatasa alcalina, el sustrato cromogénico se convierte de una forma incolora a un color visible. Por ejemplo, cuando el sustrato es fosfato de p-nitrofenilo (pNPP), la fosfatasa alcalina lo convierte en p-nitrofenóxido (forma bencenoide) que es incoloro. Sin embargo, a pH alcalino, la forma bencenoide se convierte en una forma quinonoide que es amarilla.

- 30 La expresión "indicador de pH" tal como se usa en el presente documento incluye compuestos químicos que toman diferentes colores dependiendo de la concentración de ion hidronio o hidróxido presente en una disolución acuosa. Muchos indicadores de pH cambian de un color a otro o de incoloro a un color a lo largo de un intervalo de pH particular. Esto se denomina el intervalo del indicador de pH y este intervalo varía de un indicador de pH a otro indicador de pH. La expresión "colorante indicador de pH" tal como se usa en el presente documento incluye además cualquier colorante que cambie de color o produzca un color tras un cambio de pH pero que no se use comúnmente como indicador para detectar cambios de pH en sí mismo.

- 40 La frase "tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica a un recipiente de reacción para un ensayo" significa que una composición que comprende el colorante indicador de pH y el sustrato cromogénico tiene un color que un operador del ensayo no percibirá fácilmente en el transcurso normal de realización del ensayo. Un color que no es fácilmente perceptible es un color que es demasiado débil o de intensidad insuficiente para detectarse mediante el ojo humano no asistido, particularmente al volumen que se aplica al recipiente de reacción y particularmente cuando la composición está a un pH de entre aproximadamente 3 y 6,5. En general, a medida que el volumen de una disolución con un color detectable disminuye, menos detectable o perceptible al ojo se vuelve el color de la disolución. Por ejemplo, aunque las composiciones de sustrato cromogénico y colorante indicador de pH de la presente invención pueden tener un color que en un volumen grande puede ser perceptible o detectable a simple vista, el volumen aplicado a un recipiente de reacción para un ensayo no es suficiente para permitir que el color sea fácilmente perceptible o detectable mediante el ojo del operador.

- 50 La frase "el transcurso normal de realización de una reacción del ensayo" significa realizar un ensayo usando un volumen del sustrato cromogénico y colorante indicador de pH que se usa rutinariamente para el tipo de ensayo. Por ejemplo, muchos ELISA usan entre aproximadamente 50 y 500  $\mu\text{L}$  de disolución de sustrato cromogénico y peróxido por pocillo de reacción. Por tanto, en la presente invención, el pocillo contendrá aproximadamente de 50 a 500  $\mu\text{L}$  de la disolución de sustrato cromogénico, colorante indicador de pH y peróxido por pocillo de reacción.

- 55 El término "ELISA" se refiere al ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas e incluye ELISA directo, indirecto y competitivo. El principio básico de un ELISA es usar una enzima para detectar la unión de antígeno y anticuerpo. La enzima convierte un sustrato cromogénico incoloro en un producto coloreado, indicando la presencia de una unión antígeno-anticuerpo. Puede usarse un ELISA para detectar la presencia o bien de anticuerpos o bien de antígenos particulares en una muestra. Se usa un ELISA directo principalmente para determinar la cantidad de antígeno en una muestra. En un ELISA directo, se inmoviliza un anticuerpo para un antígeno particular en el recipiente de

reacción o pocillo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido. El anticuerpo inmovilizado se une al antígeno en una muestra y se detecta el antígeno unido mediante un anticuerpo marcado con enzima específico para el antígeno. Se usa un ELISA indirecto principalmente para determinar la intensidad o cantidad de respuesta de un anticuerpo a un antígeno particular en una muestra tal como el suero de un animal. En un ELISA indirecto, se inmoviliza un antígeno en el recipiente de reacción o pocillo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido. El antígeno inmovilizado se une al anticuerpo en una muestra que es específica para el antígeno y se detecta el anticuerpo unido mediante un anticuerpo marcado con enzima específico para el anticuerpo unido. Tanto para ELISA directo como indirecto, la cantidad de producto coloreado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo en la muestra. Un ELISA competitivo es una variación en la que o bien (a) se determina la cantidad de anticuerpo en una muestra en una reacción de competencia entre el anticuerpo en la muestra y un anticuerpo marcado con enzima para un antígeno inmovilizado en el recipiente de reacción o pocillo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido o bien (b) se determina la cantidad de antígeno en una muestra en una reacción de competencia entre el antígeno en la muestra y un antígeno marcado con enzima para anticuerpo específico para el antígeno inmovilizado en el recipiente de reacción o pocillo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido. En un ELISA competitivo, la cantidad de producto coloreado es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo o antígeno en la muestra.

El término “inmunoensayo” incluye todos los métodos para detectar un antígeno o anticuerpo en una muestra tal como los ELISA y similares, e incluye inmunoensayos directo, indirecto y competitivo.

El término “analito” incluye tanto antígeno (incluyendo haptenos y lectinas) como anticuerpo. Si el analito es un antígeno o un anticuerpo depende en el tipo de inmunoensayo. Por ejemplo, en inmunoensayos para detectar un antígeno, el antígeno es el analito, mientras que en inmunoensayos para detectar un anticuerpo, el anticuerpo es el analito.

Las expresiones “reactivo inmunológico” y “anticuerpo” incluyen anticuerpos completos y derivados de los mismos. Por ejemplo, las expresiones incluyen fragmentos Fab, polipéptidos Fab recombinantes, fragmentos Fv, polipéptidos Fv de cadena sencilla recombinantes, y variaciones de los mismos. Las expresiones también incluyen tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales y anticuerpos y derivados de los mismos preparados mediante métodos de ADN recombinante.

El término “recipiente de reacción” incluye tubo de ensayo, pocillo de una placa de cultivo tisular o microtitulación, tubo capilar, cubeta y similares.

La presente invención proporciona una solución al problema de si una reacción negativa en ensayos ligados a enzimas tales como los ELISA (directos, indirectos y competitivos), inmunoensayos (directos, indirectos y competitivos), hibridaciones o similares, es negativa porque la muestra de prueba no contenía el analito que está sometándose a prueba o es negativa porque uno o más reactivos necesarios para la reacción se habían omitido incluyendo en una composición lista para usarse para ensayos ligados a enzimas un colorante indicador de pH que produce un color detectable o absorbancia cuando se añade una disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción. En una realización preferida, el colorante indicador de pH es incoloro o tiene un color que no es detectable a simple vista cuando la composición se aplica a un recipiente de reacción para el ensayo pero que produce el color detectable cuando se añade la disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción. La presente invención es particularmente útil para ensayos ligados a peroxidasa, particularmente inmunoensayos tales como los ELISA, y particularmente en aquellos ensayos que usan una etapa de parada con ácido o base para mejorar la sensibilidad del ensayo. En una realización preferida, la peroxidasa es peroxidasa del rábano (HRP). La presente invención es útil también para ensayos ligados a fosfatasa alcalina, particularmente en los ELISA que usan fosfato de p-nitrofenilo como sustrato.

En un inmunoensayo ligado a peroxidasa típico, la peroxidasa se conjuga a un primer miembro de un par de unión, por ejemplo un anticuerpo o analito. El conjugado de par de unión a peroxidasa se incubaba con una muestra que se sospecha que contiene el segundo miembro del par de unión (analito o anticuerpo) en un recipiente de reacción. Después de un tiempo suficiente para permitir que el conjugado de par de unión a peroxidasa se una al segundo miembro del par de unión para formar un complejo marcado con peroxidasa, se elimina el material no unido y el complejo marcado con peroxidasa se detecta mediante la incubación del complejo en una disolución que comprende un peróxido y un sustrato cromogénico que está preferiblemente en una forma leuco soluble en agua. La peroxidasa cataliza la oxidación mediante el peróxido del sustrato cromogénico para dar un color detectable. Para sustratos cromogénicos particulares tales como 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) u orto-fenilendiamina (OPD), la sensibilidad de la reacción se mejora mediante la detención de la reacción de oxidación con una disolución de parada que contiene un ácido, que en el caso de TMB es un aumento de sensibilidad de aproximadamente 2 a 4 veces. Una peroxidasa preferida es HRP. HRP tiene actividad máxima entre aproximadamente pH 5 y pH 7.

En la presente invención, el colorante indicador de pH se selecciona preferiblemente para que sea incoloro o tenga un color que es esencialmente indetectable a simple vista cuando se aplican una composición que comprende un sustrato cromogénico y el colorante indicador de pH a un recipiente de reacción para el ensayo (la concentración del colorante indicador de pH en la composición, el pH de la composición y el volumen de la composición dan como resultado conjuntamente que el color del colorante indicador de pH sea esencialmente indetectable a simple vista)

- 5 pero para que produzca un color que es detectable a simple vista y por absorbancia cuando el pH de la composición desciende hasta por debajo del pH de la reacción mediante la adición de una disolución de parada ácida al recipiente de reacción o se eleva hasta un pH por encima del pH de la reacción mediante la adición de una disolución de parada básica al recipiente de reacción. Sin embargo, en realizaciones particulares que comprenden sustratos cromogénicos particulares, el indicador de pH puede tener un color que es detectable a simple vista cuando se aplican una composición que comprende un sustrato cromogénico y el colorante indicador de pH a un recipiente de reacción para el ensayo. Tras la adición de la disolución de parada, el color puede seguir siendo el mismo o el color puede cambiar a otro color.
- 10 Un requisito adicional para el colorante indicador de pH es que el color o la longitud de onda de absorbancia que se produce tras la adición del ácido o base no interfiere sustancialmente con ni afecta sustancialmente de otra forma a la detección de la longitud de onda de absorbancia que se produce mediante la oxidación del sustrato cromogénico en reacciones positivas. En otras palabras, el color producido por el colorante indicador de pH tiene un intervalo de absorbancia que está fuera de o no interfiere sustancialmente con el intervalo de absorbancia para el sustrato cromogénico tras haberse añadido el ácido o la base a la reacción. Preferiblemente, el colorante indicador de pH es transparente en el intervalo de absorbancia del color del sustrato cromogénico producido antes de la adición del ácido o la base. Por ejemplo, TMB se oxida a un color azul que se convierte en amarillo tras la adición de ácido.
- 15 Un requisito adicional para el colorante indicador de pH es que el colorante indicador de pH no debe interferir sustancialmente en la reacción entre el sustrato cromogénico y la enzima.
- 20 En una realización particularmente útil de la presente invención, se proporcionan composiciones listas para usarse que comprenden una mezcla del colorante indicador de pH, un sustrato cromogénico y un peróxido. Preferiblemente, la composición incluye además una disolución tampón y otros compuestos que podrían estabilizar el sustrato cromogénico y/o indicador de pH antes de o durante la reacción o facilitar la solubilidad del sustrato cromogénico en la reacción o durante el almacenamiento cuando la composición se proporciona como una disolución acuosa. Lo más preferiblemente, las composiciones son líquidas.
- 25 Los sustratos cromogénicos adecuados para ensayos ligados a peroxidasa incluyen, pero no se limitan a, orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN), ácido 5-aminosalicílico (5AS), y 3,3',5,5'-tetraalquilbencidina tal como 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Otros sustratos cromogénicos incluyen diversos compuestos fluorescentes y quimioluminescentes.
- 30 OPD es incolora pero se oxida en una reacción de peroxidasa para dar un color amarillo con una absorbancia máxima a 450 nm. La adición de ácido a la reacción produce un color naranja estable con una absorbancia máxima a 490 nm. ABTS se oxida en una reacción de peroxidasa para dar un color azul-verde con una absorbancia máxima a 405-410 nm. La adición de SDS al 1% o ácido a la reacción produce un color azul-verde estable con un máximo de absorbancia a 405-410 nm. DAB se oxida para dar un precipitado marrón insoluble. Como tal, se usa principalmente para ensayos inmunohistoquímicos. OND se oxida en una reacción de peroxidasa para dar un color amarillo-naranja con un máximo de absorbancia a 460 nm. La reacción puede detenerse mediante la adición de un ácido tal como HCl y leerse el producto de reacción. 5AS se oxida en una reacción de peroxidasa para dar un color marrón con un máximo de absorbancia a 450 nm. La reacción puede detenerse mediante la adición de NaOH y leerse el producto de reacción a 550 nm. TMB es incolora pero se oxida en una reacción de peroxidasa para dar un color azul con una absorbancia máxima a 650 nm. La adición de ácido a la reacción produce un color amarillo estable con un máximo de absorbancia a 450 nm. De las anteriores, TMB es la más preferida por los expertos en la técnica porque no es peligrosa y es el sustrato cromogénico más ampliamente usado para inmunoensayos ligados a peróxido tales como los ELISA y similares. La presente invención incluye composiciones que comprenden uno cualquiera de los sustratos cromogénicos anteriores en combinación con un colorante indicador de pH y peróxido.
- 35 40 45 Se prefiere que el sustrato cromogénico se proporcione en una disolución acuosa o a base de agua. Preferiblemente, la disolución acuosa es a base de agua al 100% y no incluye ningún disolvente orgánico. Se prefiere adicionalmente que la disolución esté débilmente tamponada. En composiciones particulares, puede ser necesario o deseable incluir uno o más agente(s) de aumento de la solubilidad con el fin de facilitar la disolución (permanente) del sustrato cromogénico. Un ejemplo de un agente de aumento de la solubilidad adecuado es poli(alcohol vinílico). Por tanto, en realizaciones particulares, el sustrato cromogénico puede comprender un sistema de disolventes que comprende menos del 5% (v/v) de disolventes orgánicos. Se prefiere adicionalmente que el sustrato cromogénico se proporcione en mezcla con un peróxido tal como peróxido de hidrógeno o peróxido de urea.
- 50 55 En una realización preferida, la composición cromogénica comprende TMB en una disolución que es preferiblemente acuosa o a base de agua. Los ejemplos de composiciones cromogénicas de TMB disponibles comercialmente que pueden modificarse para incluir un colorante indicador de pH incluyen, pero no se limitan a, K-BLUE SUBSTRATE, K-BLUE MAX SUBSTRATE y similares disponibles de Neogen Corp. Lansing, Michigan; TMB ONE, TMB PLUS y similares disponibles de Kem-En-Tec A/S, Copenhagen, Dinamarca; sustrato TMB, sustrato TMB con colorante de seguimiento y similares disponibles de BioFX Laboratories, Inc., Owning Mills, Maryland; y kit TMB Substrate disponible de Vector Laboratories, Inc. Burlingame, California. En una realización más preferida, la composición cromogénica de TMB comprende una disolución a base de agua o acuosa al 100% que es igual que o similar a la
- 60

disolución cromogénica de TMB dada a conocer en la patente estadounidense n.º 5.206.150 concedida a Tai. En una realización particularmente preferida, la composición cromogénica de TMB no contiene ningún disolvente orgánico. Se prefiere adicionalmente que la disolución esté débilmente tamponada.

5 El colorante indicador de pH que se prefiere para la presente invención es incoloro a un pH superior a aproximadamente 2,8 o proporciona a color a un pH superior a aproximadamente 2,8 pero inferior a aproximadamente pH 7,0 que es esencialmente no detectable a simple vista a la concentración o el volumen que se usan en la reacción de un ensayo. Preferiblemente, el colorante indicador de pH es soluble en agua en al menos el estado oxidado o el estado reducido. Preferiblemente, el colorante indicador de pH es soluble en agua en ambos estados. Es particularmente importante que el colorante indicador de pH cambie de color a un pH que es inferior o superior al pH en el que se realiza la reacción de oxidación o reducción del sustrato cromogénico y que el color, que se produce mediante el colorante indicador de pH cuando se detiene la reacción mediante la adición de un ácido o una base, sea fácilmente detectable a simple vista pero sustancialmente transparente en el intervalo de absorbancia del sustrato cromogénico oxidado o reducido. Sin embargo, se prefiere que el indicador de pH también tenga una absorbancia a una longitud de onda que no interfiera con el intervalo de absorbancia del sustrato cromogénico oxidado o reducido. Por tanto, el color producido mediante el colorante indicador de pH no sólo es visible a simple vista sino medible a una longitud de onda distinta de la longitud de onda que se usa para medir el sustrato cromogénico oxidado o reducido. Esto es particularmente útil para análisis en los que un detector está adaptado para medir la absorbancia del sustrato cromogénico oxidado o reducido y la absorbancia del indicador de pH oxidado o reducido. Tales detectores incluyen a los lectores de ELISA.

20 Los ejemplos de colorantes indicadores de pH que cambian de color a un pH ácido y son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, rojo de cresol (transición de amarillo a rojo a pH 0,5-1,8), púrpura de m-cresol (transición de amarillo a rojo a pH 1,2-2,8), 2,2',2'',4,4'-pentametoxitriifenilcarbinol (transición de incoloro a rojo a pH 1,2 a 3,2 ) y benzopurpurina 4B (transición de rojo a violeta a pH 2,2-4,2). Otros colorantes indicadores de pH que pueden ser útiles incluyen, pero no se limitan a, amarillo de metanilo (transición de amarillo a rojo a pH 1,2-3,0), 4-fenilazodifenilamina (transición de amarillo a rojo a pH 1,2-2,5), verde de malaquita (transición de amarillo a azul-verde a pH 0,2-1,8), rojo de quinaldina (transición de incoloro a rojo a pH 1,0-2,2), naranja IV (transición de amarillo a rojo a pH 1,4-2,8), azul de timol (transición de rojo a amarillo a pH 1,2 a 2,8), azul de xilenol (transición de amarillo a rojo a pH 1,8 a 2,8) y combinaciones de los mismos.

30 Los ejemplos de colorantes indicadores de pH que cambian de color a un pH alcalino y son útiles con sustratos cromogénicos tales como 5AS incluyen, pero no se limitan a, colorantes tales como fenoltaleína (transición de incoloro a rojo a pH 8,0 a 10), timoltaleína (transición de incoloro a azul a pH 8,8 a 10,5 ), amarillo de alizarina R (transición de amarillo a púrpura a pH 10 a 12), carmín de índigo (transición de azul a amarillo a pH 11,4 a 13), púrpura de m-cresol (transición de amarillo a púrpura a pH 7,4 a 9,0), rojo de cresol (transición de amarillo o naranja a púrpura a pH 7,0-8,8), azul de timol (transición de amarillo a azul a pH 8,0 a 9,6), azul de xilenol (transición de amarillo a azul a pH 8,0 a 9,6) y combinaciones de los mismos.

35 El colorante indicador de pH particular usado en un ensayo es el colorante indicador de pH que es adecuado para su uso con el sustrato cromogénico usado en el ensayo. En otras palabras, el indicador de pH tiene una absorbancia que no interfiere con la absorbancia del sustrato cromogénico tras la reacción y produce un color que es detectable a simple vista (visiblemente coloreado) tras detener la reacción con una disolución de parada pero que es incoloro o tiene un color que es esencialmente indetectable a simple vista cuando está en el recipiente de reacción antes de añadir la disolución de parada a la reacción. Un colorante indicador de pH preferido para su uso en combinación con TMB es púrpura de m-cresol. El púrpura de m-cresol se usa preferiblemente a una concentración que lo hace esencialmente indetectable a simple vista en el volumen en el que la disolución cromogénica de TMB se aplica a un recipiente de reacción y al pH de la mayoría de disoluciones cromogénicas de TMB (la mayoría de disoluciones cromogénicas de TMB están débilmente tamponadas, habitualmente en un tampón entre aproximadamente pH 3,8 y aproximadamente pH 6,5) pero que aún le permite ser detectable a simple vista cuando el pH de la disolución se reduce mediante adición de una disolución de parada ácida. La capacidad para detectar a simple vista el púrpura de m-cresol en una composición que contiene la TMB en un recipiente de reacción antes de añadir la disolución de parada ácida es una función de la concentración del púrpura de m-cresol en la composición y el volumen de la composición en el recipiente de reacción. Por tanto, el púrpura de m-cresol está a una concentración en la composición que lo hace visualmente indetectable cuando la composición se aplica a un recipiente de reacción.

40 Cuando se añade una disolución de parada ácida a la composición en el recipiente de reacción, el pH se reduce hasta por debajo de pH 2,8 y el púrpura de m-cresol se oxida para dar un color rosa-rosado. El color rosa-rosado es detectable a simple vista incluso cuando el púrpura de m-cresol está a una concentración y la composición está a un volumen que lo convierte en esencialmente indetectable a simple vista antes de añadir la disolución de parada ácida. El púrpura de m-cresol oxidado tiene una absorbancia máxima a aproximadamente 524-542 nm. La absorbancia máxima no interfiere con la absorbancia máxima de TMB (u OPD, ODN, o ABTS). Por tanto, o bien mediante observación visual o bien midiendo la absorbancia a 524-542 nm, un usuario de la composición puede determinar fácilmente si una reacción era negativa porque la muestra no contenía el analito o la composición se había omitido de la reacción.

55

60

- 5 En una reacción de detección típica para un conjugado de peroxidasa (por ejemplo, un conjugado de HRP), el recipiente de reacción comprende en mezcla acuosa el conjugado de peroxidasa y una composición que comprende un sustrato cromogénico oxidable tal como TMB, OPD, OND, 5AS, ABTS, o similares, y un colorante indicador de pH con una absorbancia a un pH ácido o pH básico diferente de la absorbancia del sustrato cromogénico oxidado al pH ácido o pH básico. Por ejemplo, TMB, OPD, y ABTS oxidados a un pH ácido tienen una absorbancia máxima a 450, 490 y 405 nm, respectivamente, y púrpura de m-cresol oxidado con ácido tiene una absorbancia máxima a 530 nm. Preferiblemente, la composición anterior incluye además peróxido de urea o hidrógeno. Se prefiere además que la razón del sustrato cromogénico con respecto al colorante indicador de pH esté entre 10 a 1 y 1 a 10.
- 10 Durante la reacción, el sustrato cromogénico se oxida o reduce a un estado que tiene un primer color o longitud de onda de absorbancia máxima. La reacción se detiene entonces mediante la adición de una disolución de parada que comprende un ácido (ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido fosfórico (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) o similares) o una base tal como hidróxido de sodio (NaOH). El ácido o la base detiene la oxidación o reducción anterior del sustrato cromogénico y para algunos sustratos tales como TMB u OPD, provoca una oxidación adicional del sustrato cromogénico para dar un segundo color o longitud de onda de absorbancia máxima. También provoca oxidación o
- 15 reducción del colorante indicador de pH para dar un tercer color o longitud de onda de absorbancia máxima. Para otros sustratos cromogénicos tales como ABTS u OND, el color del producto oxidado o reducido no cambia tras la adición del ácido. Para 5AS, la reacción se detiene con una base tal como NaOH que convierte el sustrato cromogénico oxidado en un producto con un máximo de absorbancia a 550 nm. Para formulaciones particulares de TMB, el color de la TMB sigue siendo azul tras la adición de la parada con ácido.
- 20 En una reacción típica, una reacción positiva que contiene el conjugado de peroxidasa se detecta visualmente a simple vista o mediante absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima para el sustrato cromogénico oxidado y una reacción negativa que no contiene conjugado de peroxidasa se detecta visualmente a simple vista o mediante absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima para el indicador de pH oxidado. En el caso de reacciones falsas negativas tales como las que contienen conjugado de peroxidasa pero no la composición que comprende el sustrato cromogénico, el ácido o ambos, la reacción es incolora a simple vista y no tiene absorbancia a o bien la primera o bien la segunda o bien la tercera longitud de onda de absorbancia máxima. Por tanto, las reacciones que no tienen absorbancia a la primera o segunda longitud de onda de absorbancia máxima pero tienen absorbancia a la tercera longitud de onda de absorbancia máxima se califican como negativas mientras que todas las reacciones sin absorbancia a la tercera longitud onda de absorbancia máxima se califican como falsas negativas.
- 25 En un lector de ELISA automatizado, el lector ELISA calificará correctamente las reacciones con una primera (sin ácido) o segunda longitud de onda de absorbancia máxima (con ácido) como positivas y las reacciones con la tercera longitud de onda de absorbancia máxima como negativas. En el caso de una reacción en la que o bien el ácido (o la base) o bien la composición se han omitido, no hay primera, segunda ni tercera longitud de onda de absorbancia máxima. Un lector de ELISA automatizado calificará correctamente la reacción anterior como un falso negativo. Por tanto, la composición de la presente invención no sólo permite la detección de reacciones positivas sino también permite que se distingan reacciones negativas de falsas negativas.
- 30 Mientras que las composiciones anteriores comprenden un colorante indicador de pH que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando la composición se aplica a un recipiente de reacción para el ensayo, en el caso de ensayos que comprenden OPD, OND, 5AS, ABTS y algunos ensayos que comprenden TMB, el colorante indicador de pH que comprende la composición puede tener un color que es detectable a simple vista cuando la composición se aplica al recipiente de reacción. No es necesario que el colorante indicador de pH sea incoloro o tenga un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando la composición se aplica al recipiente de reacción. Sin embargo, el colorante indicador de pH que comprende la composición preferiblemente forma un segundo color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una
- 35 segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción. La segunda longitud de onda no puede interferir sustancialmente con la detección de la primera longitud de onda para el color formado por el sustrato cromogénico.
- 40 En una reacción de detección preferida, la reacción comprende conjugado de HRP en una composición acuosa que comprende TMB como sustrato cromogénico y un colorante indicador de pH tal como púrpura de m-cresol. Preferiblemente, la composición anterior incluye además peróxido de urea o hidrógeno. Se prefiere además que la composición sea a base de agua al 100%. Para muchas formulaciones, la razón de TMB con respecto a colorante indicador de pH es habitualmente de entre aproximadamente 10 a 1 y 1 a 10. En general, la disolución cromogénica y la reacción tienen un pH de aproximadamente 3,8 a 6,5. Cuando el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol, la cantidad preferida del púrpura de m-cresol es inferior a aproximadamente 10 µg de sal de sodio de púrpura de m-cresol por ml de sustrato TMB, más preferiblemente, menos de aproximadamente 2,2 µg/ml, más preferible aún aproximadamente 1,1 µg/ml. Esta cantidad de púrpura de m-cresol en disolución con el sustrato TMB hace que sea esencialmente indistinguible o indetectable a simple vista al volumen normalmente usado para una reacción en un ensayo de disoluciones sin el púrpura de m-cresol antes de la adición de la disolución de parada al volumen pero aún produce un color distinguible o detectable tras la adición de la disolución de parada.
- 45 50 55 60 Durante la reacción, la TMB se oxida a un estado que es visualmente azul y que tiene un máximo de absorbancia a aproximadamente 650 nm. Tras la adición de una disolución de parada (preferiblemente, una disolución de parada

que comprende HCl a aproximadamente 1 M o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a aproximadamente 0,2 M), el pH de la reacción se reduce. El pH reducido detiene la reacción y oxida adicionalmente TMB en el estado azul a un estado de diamina. En el estado de diamina, la TMB oxidada es visualmente amarilla y tiene una absorbancia máxima a aproximadamente 450 nm. Mientras tanto, el púrpura de m-cresol, que es esencialmente indetectable a pH 3,8 a 6,5 debido a su baja concentración en la composición (menos de aproximadamente 10 µg/ml) y el pequeño volumen de reacción (en general, habitualmente menos de aproximadamente 200 µl), se oxida mediante el ácido para dar un color rosa-rosado (rojo claro) que es visible a simple vista y tiene una absorbancia máxima a aproximadamente 530-540 nm. Por tanto, en una reacción típica, una reacción positiva que contiene conjugado de HRP puede detectarse visualmente a simple vista como un color rosa-rosado o mediante absorbancia a 450 nm y una reacción negativa que no contiene conjugado de HRP puede detectarse visualmente a simple vista como un color rosa-rosado o midiendo la absorbancia a aproximadamente 520 a 565 nm, preferiblemente a aproximadamente 530 ó 540 nm. En el caso de reacciones falsas negativas tales como las que contienen conjugado de HRP pero en las que la composición preferida, la parada con ácido, o ambas se habían omitido, la reacción es incolora a simple vista y no tiene absorbancia significativa a 450 ó 530 ó 540 nm. Por tanto, las reacciones que no tienen absorbancia a 450 nm pero tienen absorbancia a 530 ó 540 nm se califican como negativas mientras que todas las reacciones sin absorbancia a 530 ó 540 nm se califican como falsas negativas.

En un lector de ELISA automatizado, el lector de ELISA calificará correctamente las reacciones amarillas como positivas y las reacciones de color rosa-rosado como negativas. En el caso de una reacción en la que o bien la parada con ácido o bien la composición se habían omitido, el color que se produce es azul o incoloro, respectivamente. Un lector de ELISA automatizado calificará correctamente las reacciones anteriores como falsas negativas.

En una realización adicional del método anterior que usa TMB como sustrato cromogénico, pueden usarse paradas con ácido que detienen la reacción pero no cambian el color azul de la reacción a amarillo tal como RED STOP (disponible de Neogen Corp., Lansing, MI). Por tanto, la absorbancia de reacciones positivas sigue siendo azul y su absorbancia se lee a 650 nm. El colorante indicador de pH se selecciona para que no absorba en el intervalo de absorbancia de 650. El púrpura de m-cresol es uno de tales colorantes indicadores de pH que no absorbe a 650 nm.

La presente invención incluye además usos de kits para detectar un analito en un ensayo ligado a enzimas y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo que comprende las composiciones anteriores. Las composiciones anteriores pueden proporcionarse en forma líquida o sólida. Cuando se proporciona en forma sólida, la composición puede estar en forma de cápsula, comprimido o polvo. En una realización, el kit comprende uno o más primeros recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico y un colorante indicador de pH adecuado para su uso con el sustrato cromogénico y uno o más segundos recipientes cada uno de los cuales contiene un peróxido tal como peróxido de hidrógeno o peróxido de urea. En una segunda realización, el kit comprende uno o más recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico, un peróxido tal como peróxido de hidrógeno o peróxido de urea, y un indicador de pH adecuado para su uso con el sustrato cromogénico. En realizaciones adicionales de los kits anteriores, los kits contienen además un recipiente que contiene una disolución de parada.

Los kits anteriores son particularmente útiles para su uso en inmunoensayos ligados a peroxidasa tales como los ELISA. En los kits anteriores, se prefiere que el sustrato cromogénico se seleccione del grupo que consiste en OPD, OND, ABTS, 5AS y TMB. Se prefiere adicionalmente que el colorante indicador de pH para las paradas con ácido se seleccione del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, rojo de quinaldina, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenilcarbinol y combinaciones de los mismos. Se prefiere adicionalmente que el colorante indicador de pH para su uso con 5AS se seleccione del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos. En una realización más preferida, el sustrato cromogénico es TMB o ABTS y el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol. En realizaciones adicionales de los kits anteriores, la parada con ácido se modifica para inhibir la oxidación adicional de TMB azul a amarillo.

La composición de la presente invención puede proporcionarse adicionalmente como un componente de los ELISA ligados a peroxidasa. Por tanto, la presente invención incluye además kits que comprenden un ELISA ligado a peroxidasa para un analito, uno o más primeros recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico y un colorante indicador de pH adecuado para su uso con el sustrato cromogénico, y uno o más segundos recipientes cada uno de los cuales contiene un peróxido tal como peróxido de hidrógeno o peróxido de urea y kits que comprenden un ELISA ligado a peroxidasa para un analito y uno o más recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico, un peróxido tal como peróxido de hidrógeno o peróxido de urea, y un indicador de pH adecuado para su uso con el sustrato cromogénico. En realizaciones adicionales de los kits anteriores, los kits contienen además un recipiente que contiene una disolución de parada.

En los kits ELISA anteriores, se prefiere que el sustrato cromogénico se seleccione del grupo que consiste en OPD, OND, ABTS, 5AS y TMB. Se prefiere adicionalmente que el colorante indicador de pH para las paradas con ácido se seleccione del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, benzopurpurina 4B, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, rojo de quinaldina, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenilcarbinol y combinaciones de los mismos. Se prefiere adicionalmente que el colorante indicador de pH para su uso con 5AS se

seleccione del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos. En la realización más preferida, el sustrato cromogénico es TMB o ABTS y el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol. En realizaciones adicionales de los kits anteriores, la parada con ácido se modifica para inhibir la oxidación adicional de TMB azul a amarillo.

- 5 Las composiciones y los kits anteriores pueden incluir además uno o más de los colorantes visibles dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.221.624 B1 concedida a Lihme *et al.* Por tanto, la composición de la presente invención puede incluir composiciones que comprenden TMB, colorante indicador de pH y un colorante visible que es detectable a simple vista en el recipiente de reacción del ensayo antes de la adición de la disolución de parada. El colorante visible se selecciona para que no interfiera sustancialmente con la absorbancia de la TMB oxidada o con la oxidación de la TMB y no interfiera sustancialmente con el cambio de color del colorante indicador de pH. Preferiblemente, la composición anterior incluye además peróxido de hidrógeno. Por tanto, en un ensayo, el colorante visible hace que la composición sea visible a simple vista cuando se añade a un inmunoensayo; el sustrato cromogénico permite que se identifiquen reacciones que contienen el analito; y el colorante indicador de pH permite que se distingan reacciones negativas de reacciones falsas negativas.
- 10 El método y los kits anteriores pueden adaptarse para su uso en inmunoensayos basados en fosfatasa alcalina tales como los ELISA basados en fosfatasa alcalina. En el caso de ensayos basados en fosfatasa alcalina, la composición comprende fosfato de p-nitrofenilo (PNNP) y un colorante indicador de pH. PNNP se hidroliza mediante la fosfatasa alcalina a óxido de p-nitrofenilo en condiciones básicas. En condiciones de reacción típicas, el óxido de p-nitrofenilo es un equilibrio entre su forma bencenoide incolora y su forma quinonoide amarilla. La adición de una disolución de parada que comprende una base tal como hidróxido de sodio (NaOH) o fosfato de dipotasio ( $K_2HPO_4$ ) a la reacción detiene la reacción y desplaza el equilibrio hacia la forma quinonoide. La forma quinonoide tiene una absorbancia máxima a 405 y 605 nm. Por tanto, un colorante indicador de pH adecuado para la reacción anterior debe ser un colorante que cambia de color a un pH alto. Tales colorantes indicadores de pH incluyen, pero no se limitan a, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos. En el caso de inmunoensayos basados en fosfatasa alcalina tales como los ELISA basados en fosfatasa alcalina, el colorante indicador de pH que comprende la composición puede tener un color que es detectable a simple vista cuando la composición se aplica al recipiente de reacción. No es necesario que el colorante indicador de pH sea incoloro o tenga un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando la composición se aplica al recipiente de reacción. Sin embargo, el colorante indicador de pH que comprende la composición debe formar un segundo color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción. La segunda longitud de onda no puede interferir sustancialmente con la detección de la primera longitud de onda.
- 15  
20  
25  
30

La composición anterior puede proporcionarse en uno o más recipientes en un kit. El kit puede incluir además un recipiente que contiene una disolución de parada. La composición puede incluirse adicionalmente como un componente de un kit de ELISA ligado a fosfatasa alcalina para detectar analitos particulares.

35

En realizaciones particulares de los métodos y kits anteriores, la composición puede incluir además uno o más de los colorantes dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.221.624 B1 concedida a Lihme *et al.*

### Ejemplo 1

Este ejemplo muestra que en una reacción de HRP la absorbancia del púrpura de m-cresol no interfiere con la absorbancia de TMB.

40

Se proporcionó la TMB como una disolución a base de agua al 100% disponible como K-BLUE AQUEOUS, Neogen Corporation, Lansing, Michigan. A 10 ml de disolución de TMB, se le añadieron 22 µg de púrpura de m-cresol para preparar una disolución indicadora positiva/negativa. Aunque que el púrpura de m-cresol se solubilizó inmediatamente, para garantizar una dispersión uniforme del colorante indicador de pH, la mezcla se agitó durante aproximadamente cinco minutos. La cantidad de púrpura de m-cresol añadida era una cantidad que se determinó que no era visualmente detectable a simple vista. Durante la agitación, la disolución pasó de incolora a un color paja ligero. Este cambio de color podría deberse a la formulación particular de TMB usada. Algunas formulaciones de TMB producirán un color en disolución. Se encontró que es preferible añadir 11 µg de púrpura de m-cresol a 10 ml de la disolución de TMB en vez de 22 µg. A esta concentración, el color paja-amarillo era esencialmente indistinguible a simple vista pero aún se producía un color rosa-rosado detectable tras la adición de la disolución de parada. Se evaluó el rendimiento de la disolución que contenía púrpura de m-cresol a una concentración de 2,2 µg/ml incubando una alícuota de 15 µl de la disolución con una HRP en una cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. Se midieron los espectros de la reacción frente a agua en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601.

45  
50

La figura 1 muestra los espectros de la reacción. La línea negra (-) son los espectros para un blanco que contiene la disolución pero no HRP y la línea verde (-•-) son los espectros para el blanco con el ácido añadido al mismo. Tal como puede observarse, el blanco era transparente entre aproximadamente 344 nm hasta más de 686 nm. Visualmente, la disolución era de un color paja ligero, sin embargo, el color se atribuyó a la formulación de TMB. Sin embargo, la adición de ácido a la disolución oxidó el púrpura de m-cresol, lo que produjo una absorbancia a entre aproximadamente 524 y 542 nm. Visualmente, la disolución era de color rosa-rosado. Para la cubeta que contenía

55

HRP, después de 15 minutos, se oxidó la TMB para dar un color azul con una absorbancia máxima a aproximadamente 650 nm (línea azul (-x-)). Obsérvese que no había absorbancia entre aproximadamente 524 y 542 nm. Después de añadir ácido a la reacción, se oxidó adicionalmente la TMB a su estado de diamina que tenía una absorbancia máxima a aproximadamente 450 nm y se oxidó el m-cresol para producir una absorbancia a entre aproximadamente 524 y 542 nm (línea roja (-|-)). Visualmente, la disolución era una combinación de color amarillo y rosa-rosado.

### Ejemplo 2

En este ejemplo, se comparó el rendimiento de TMB con púrpura de m-cresol en reacciones de HRP con el rendimiento de TMB sola. En este ejemplo, se usó un formato de micropocillos de ensayo de ELISA competitivo directo para detectar opiáceos (kit Opiate Group 100619 de Neogen Corp.). El ensayo funciona basándose en la competición entre opiáceos en la muestra y conjugados de opiáceo-HRP para un número limitado de sitios de unión específicos en pocillos de microplacas recubiertos previamente.

En este ejemplo, se añadió una disolución de 180  $\mu$ l de conjugado de opiáceo-HRP a cada uno de los pocillos recubiertos previamente de una placa de microtitulación para unir el opiáceo-HRP a los sitios en los pocillos a temperatura ambiente. Se reservó un conjunto de dieciséis pocillos que sirven como controles. Se incubaron los controles con blancos de tampón que no contenían opiáceo-HRP. Después de 45 minutos, se eliminó la disolución de cada uno de los pocillos y se lavaron los pocillos tres veces con 300  $\mu$ l de disolución de lavado que contenía solución salina tamponada con fosfato y TWEEN. A continuación, se añadieron 150  $\mu$ l de una disolución de TMB (K-BLUE AQUEOUS, lote n.º 020524) a la mitad de los micropocillos y se añadieron 150  $\mu$ l de disolución de TMB con púrpura de m-cresol a 2,2  $\mu$ g/ml a la otra mitad de los pocillos. A medida que la reacción avanzaba, los pocillos con HRP se pusieron azules. Después de aproximadamente 30 minutos, se leyó la absorbancia a 650 nm para los pocillos usando un lector de ELISA.

Los resultados de una curva patrón de ocho puntos para los pocillos que se habían incubado con opiáceo-HRP mostraron que la absorbancia del color a 650 nm era similar para ambos conjuntos de pocillos (DO de 1,244 para los pocillos con TMB y DO de 1,201 para los pocillos con TMB con púrpura de m-cresol) y las sensibilidades eran similares (I-50 de 0,16 ng/ml para los pocillos con TMB y 0,15 ng/ml para los pocillos con TMB con púrpura de m-cresol). Para los pocillos control, la DO<sub>650</sub> fue de 0,044 para los pocillos que contenían TMB y 0,047 para los pocillos que contenían TMB con azul de m-cresol.

Todos los ensayos anteriores se detuvieron entonces mediante la adición de 50  $\mu$ l de HCl 1 N a cada uno de los pocillos. Todos los pocillos que se habían incubado con opiáceo-HRP desarrollaron un color similar a 450 nm. El ácido añadido a ocho de los pocillos control que contenían TMB dio como resultado pocillos incoloros y el ácido añadido a los ocho pocillos control restantes que contenían TMB y púrpura de m-cresol dio como resultado pocillos de color rosa-rosado claro. Se midió la absorbancia de los pocillos de color rosa-rosado a 562 nm debido a las elecciones limitadas de filtros disponibles con el lector de ELISA. Se prefirió un filtro de 540 nm. La DO<sub>450</sub> fue similar para ambos conjuntos de controles (0,065 para los pocillos control que contenían TMB frente a 0,079 para los pocillos control que contenían TMB con púrpura de m-cresol. Sin embargo, la DO<sub>562</sub> era superior para los pocillos control que contenían TMB con púrpura de m-cresol (0,069 para los pocillos control que contenían TMB con púrpura de m-cresol frente a 0,041 para los pocillos control que contenían TMB). La DO<sub>562</sub> se mantuvo relativamente estable incluso 4 horas tras haberse añadido el ácido (0,079 para los pocillos control que contenían TMB con púrpura de m-cresol frente a 0,043 para los pocillos control que contenían TMB).

Además de lo anterior, se compararon las composiciones de TMB y las composiciones de TMB con púrpura de m-cresol añadiendo dos volúmenes diferentes de cada una a 4 micropocillos vacíos en una placa de microtitulación Costar convencional. Se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA usando un blanco de aire.

En el primer experimento, se añadieron 100  $\mu$ l de cada composición a los pocillos vacíos. La DO<sub>450</sub> promedio fue de 0,043 para los pocillos vacíos que contenían TMB y de 0,063 para los pocillos vacíos que contenían TMB con púrpura de m-cresol. La DO<sub>562</sub> promedio fue de 0,041 para los pocillos vacíos que contenían TMB y de 0,037 para los pocillos vacíos que contenían TMB con púrpura de m-cresol.

En el segundo experimento, se añadieron 150  $\mu$ l de cada composición a los pocillos vacíos. La DO<sub>450</sub> promedio fue de 0,044 para los pocillos vacíos que contenían TMB y de 0,078 para los pocillos vacíos que contenían TMB con púrpura de m-cresol. La DO<sub>562</sub> promedio fue de 0,041 para los pocillos vacíos que contenían TMB y de 0,040 para los pocillos vacíos que contenían TMB con púrpura de m-cresol. Los resultados muestran que el púrpura m-cresol es transparente a la longitud de onda del indicador (DO<sub>562</sub>) en ausencia de ácido.

### EJEMPLO 3

Este ejemplo muestra que usando el púrpura de m-cresol a una concentración de 1,1  $\mu$ g/ml, el sustrato TMB producía un color rosa-rosado tras la adición de la disolución de parada aún cuando el color de la disolución era indistinguible de antemano.

5 Las disoluciones de TMB usadas fueron K-BLUE AQUEOUS, K-BLUE ENHANCED y K-BLUE MAX (Neogen Corporation, Lansing, Michigan). A un pocillo de una microplaca COSTAR convencional se le añadieron 100  $\mu$ l de disolución de TMB con o sin 1,1  $\mu$ g/ml de púrpura de m-cresol. Se leyeron las absorbancias a 450 nm, 650 nm y 540 nm. Después de eso, se añadieron 100  $\mu$ l de disolución de parada ácida y se leyeron las absorbancias a 450 nm, 650 nm y 540 nm. Se midieron las densidades ópticas en un lector de microplacas VMAX (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California) provisto de filtros de 450 nm, 650 nm y 540 nm. El blanco era aire. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Muestra	100 $\mu$ l de sustrato			+ 100 $\mu$ l de ácido (200 $\mu$ l en total)		
	DO <sub>450</sub>	DO <sub>650</sub>	DO <sub>540</sub>	DO <sub>450</sub>	DO <sub>650</sub>	DO <sub>540</sub>
K-BLUE AQUEOUS						
Sustrato	0,044	0,037	0,039	0,040	0,035	0,036
Sustrato con Indicador	0,048	0,032	0,034	0,042	0,034	0,057
K-BLUE ENHANCED						
Sustrato	0,040	0,034	0,035	0,042	0,035	0,038
Sustrato con Indicador	0,052	0,036	0,037	0,042	0,032	0,057
K-BLUE MAX						
Sustrato	0,039	0,032	0,034	0,045	0,031	0,034
Sustrato con Indicador	0,049	0,032	0,035	0,042	0,030	0,055

10 Para los volúmenes usados, las diferencias en DO<sub>450</sub> entre sustrato y sustrato con indicador no eran fácilmente distinguibles a simple vista aún cuando las diferencias en DO<sub>540</sub> eran fácilmente distinguibles a simple vista como un color rosa-rosado claro. Por tanto, este ejemplo muestra que usando el púrpura de m-cresol a una concentración de aproximadamente 1,1  $\mu$ g/ml de disolución de sustrato podía producir un color visible y un aumento de absorbancia detectable a 540 nm tras la adición del ácido aún cuando no podía distinguirse un color antes de añadir el ácido.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un analito en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) basado en peroxidasa y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende:
  - 5 (a) proporcionar una composición que comprende una mezcla de un sustrato cromogénico que es oxidable mediante peróxido en una reacción para el ELISA catalizada por la peroxidasa del ELISA para formar un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda, un colorante indicador de pH que forma un segundo color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada a la composición en un recipiente de reacción, y un peróxido;
  - 10 (b) añadir una alícuota de la composición a cada uno de los recipientes de reacción para el ELISA para formar una mezcla de reacción;
  - (c) incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para oxidar el sustrato cromogénico al primer color;
  - 15 (d) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción para detener la reacción y generar el segundo color; y
  - (e) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia sólo a la segunda longitud de onda indica la reacción negativa, y ausencia de absorbancia a la primera y segunda longitudes de onda indica la reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la composición y la disolución de parada.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el indicador de pH es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que forma el segundo color que es detectable a simple vista y tiene la absorbancia a la segunda longitud de onda cuando se añade la disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción.
- 25 3. El método según la reivindicación 1, en el que la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN), y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- 30 4. El método según la reivindicación 1, en el que la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico es ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
5. El método según la reivindicación 1, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
- 35 6. El método según la reivindicación 1, en el que la disolución de parada es una base y el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS).
7. El método según la reivindicación 6, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
- 40 8. El método según la reivindicación 1, en el que el ELISA se selecciona del grupo que consiste en ELISA directo, indirecto y competitivo.
9. El método según la reivindicación 1, en el que el sustrato cromogénico es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- 45 10. El método según la reivindicación 9, en el que el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol.
11. El método según la reivindicación 9, en el que la primera longitud de onda es de aproximadamente 450 nm y la segunda longitud de onda es superior a 500 nm.
12. El método según la reivindicación 3 ó 4, en el que el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- 50 13. Uso de un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el inmunoensayo y en el que el inmunoensayo es para la detección colorimétrica de un analito de un

- tipo en el que se adsorbe una cantidad de un primer anticuerpo en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un reactivo inmunológico y una peroxidasa; se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el analito, el analito se une al primer anticuerpo y al conjugado para formar un complejo inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del analito midiendo la reacción del complejo inmunológico con un sustrato cromogénico oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, que comprende:
- 5 (a) proporcionar una disolución líquida que comprende el sustrato cromogénico, peróxido y un colorante indicador de pH, en la que el sustrato cromogénico es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda y el colorante indicador de pH produce un segundo color es detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida;
  - 10 (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida el sustrato cromogénico al primer color;
  - 15 (c) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el segundo color; y,
  - 20 (d) medir espectrográficamente las absorbancias a las primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa, y una ausencia de absorbancia a la primera y segunda longitud de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.
14. 25 Uso según la reivindicación 13, en el que el indicador de pH es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que forma el segundo color que es detectable a simple vista y tiene la absorbancia a la segunda longitud de onda cuando se añade la disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción.
  15. 30 Uso según la reivindicación 13, en el que la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN), y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
  16. Uso según la reivindicación 13, en el que la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico es ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
  17. 35 Uso según la reivindicación 13, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
  18. Uso según la reivindicación 13, en el que la disolución de parada es una base y el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS).
  19. 40 Uso según la reivindicación 18, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
  20. Uso según la reivindicación 13, en el que el sustrato cromogénico es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
  21. Uso según la reivindicación 20, en el que el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol.
  22. Uso según la reivindicación 20, en el que la primera longitud de onda es de aproximadamente 450 nm y la segunda longitud de onda es superior a 500 nm.
  23. 45 Uso según la reivindicación 15 ó 16, en el que el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
  24. 50 Uso de un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el inmunoensayo y en el que el inmunoensayo es para la detección colorimétrica de un anticuerpo de un tipo en el que se adsorbe una cantidad de un analito en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un reactivo inmunológico y una peroxidasa; se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el anticuerpo, el anticuerpo se une al analito y al conjugado para formar un complejo inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del anticuerpo midiendo la reacción del complejo inmunológico con un sustrato cromogénico oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, que comprende:

- 5 (a) proporcionar una disolución líquida que comprende el sustrato cromogénico, peróxido y un colorante indicador de pH, en la que el sustrato cromogénico es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda y el colorante indicador de pH produce un segundo color que es detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida;
- (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida el sustrato cromogénico al primer color;
- 10 (c) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el segundo color; y,
- (d) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa, y una ausencia de absorbancia a la primera y segunda longitudes de onda indica a una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.
- 15 25. Uso según la reivindicación 24, en el que el indicador de pH es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que forma el segundo color que es detectable a simple vista y tiene la absorbancia a la segunda longitud de onda cuando se añade la disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción.
- 20 26. Uso según la reivindicación 24, en el que la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN), y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- 25 27. Uso según la reivindicación 24, en el que la disolución de parada es un ácido y el sustrato cromogénico es ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
28. Uso según la reivindicación 24, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
- 30 29. Uso según la reivindicación 24, en el que la disolución de parada es una base y el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS).
30. Uso según la reivindicación 24, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenolftaleína, timolftaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
- 35 31. Uso de un inmunoensayo enzimático según la reivindicación 24, en el que el sustrato cromogénico es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
32. Uso según la reivindicación 31, en el que el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol.
33. Uso según la reivindicación 31, en el que la primera longitud de onda es de aproximadamente 450 nm y la segunda longitud de onda es superior a 500 nm.
- 40 34. Uso según la reivindicación 31, en el que el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
35. Uso de un kit para detectar un analito en un ensayo ligado a enzimas y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende: uno o más primeros recipientes cada uno de los cuales contiene una mezcla de un sustrato cromogénico con una absorbancia a una primera longitud de onda, un colorante indicador de pH adecuado para el uso con el sustrato cromogénico, que produce un color detectable a simple vista que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la mezcla en el recipiente de reacción, y un peróxido,
- 45 en el que las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda se miden espectrográficamente,
- 50 en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa, y una ausencia de absorbancia a la primera y segunda longitud de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.

- 5 36. Uso según la reivindicación 35, en el que el indicador de pH es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ensayo pero que forma el segundo color que es detectable a simple vista y tiene la absorbancia a la segunda longitud de onda cuando se añade la disolución de parada a la composición en el recipiente de reacción.
37. Uso según la reivindicación 35, en el que el primer recipiente contiene el sustrato cromogénico y el colorante indicador de pH, y un segundo recipiente contiene el peróxido.
38. Uso según la reivindicación 35 ó 36, en el que el kit incluye además un tercer recipiente que contiene una disolución de parada ácida o básica.
- 10 39. Uso según la reivindicación 35, en el que el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN), y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- 15 40. Uso según la reivindicación 35, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, rojo de quinaldina, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriphenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
41. Uso según la reivindicación 35, en el que el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS).
42. Uso según la reivindicación 41, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
- 20 43. Uso según la reivindicación 35, en el que el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol y el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
44. Uso según la reivindicación 35, en el que el ensayo ligado a enzimas es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- 25 45. Uso según la reivindicación 35, en el que el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN) que se convierte mediante una enzima en un recipiente de reacción para el ensayo a un primer color.
46. Uso según la reivindicación 45, en el que el sustrato cromogénico es fosfato de p-nitrofenilo.
- 30 47. Uso según la reivindicación 46, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
48. Uso de una composición para el uso en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ELISA, que comprende en una mezcla:
- 35 (a) un sustrato cromogénico que es oxidable por un peróxido generado en el ELISA en una mezcla de reacción a la que se le añade posteriormente una disolución de parada para detener la reacción para formar un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda; y
- 40 (b) un colorante indicador de pH que es incoloro o tiene un color que es esencialmente no detectable a simple vista cuando se aplica la composición a un recipiente de reacción para el ELISA pero que produce un segundo color detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la composición en el recipiente de reacción, en el que las absorbancias a las primera y segunda longitudes de onda se miden espectrográficamente, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa y una ausencia de absorbancia a las primera y segunda longitud de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.
- 45 49. Uso según la reivindicación 48, en el que el sustrato cromogénico se selecciona del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN).
- 50 50. Uso según la reivindicación 49, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, rojo de quinaldina, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriphenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
51. Uso según la reivindicación 48, en el que el sustrato cromogénico es ácido 5-aminosalicílico (5AS).

52. Uso según la reivindicación 51, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en fenolftaleína, timolftaleína, amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
53. Uso según la reivindicación 48, en el que el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol y el sustrato cromogénico es ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
- 5 54. Uso según la reivindicación 48, en el que el sustrato cromogénico es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
55. Uso según la reivindicación 54, en el que el colorante indicador de pH es púrpura de m-cresol.
56. Un método para detectar un analito en un ensayo ligado a enzimas y distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende:
- 10 (a) proporcionar una composición que comprende una mezcla de un sustrato cromogénico seleccionado del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN) que se convierte mediante una enzima en un recipiente de reacción para el ensayo a un primer color que tiene una absorbancia a una primera longitud de onda y un colorante
- 15 indicador de pH que produce un segundo color detectable a simple vista y que tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o básica a la composición en el recipiente de reacción;
- (b) añadir una alícuota de la composición al recipiente de reacción para el ensayo ligado a enzimas para formar una mezcla de reacción;
- (c) incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el primer color;
- 20 (d) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción para detener la reacción y generar el segundo color con la segunda longitud de onda; y
- (e) medir espectrográficamente absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica la detección del analito, absorbancia sólo a la
- 25 segunda longitud de onda indica la reacción negativa, y ausencia de absorbancia a las primera y segunda longitudes de onda indica la reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la composición y la disolución de parada.
57. El método según la reivindicación 56, en el que la enzima es una fosfatasa alcalina, el sustrato cromogénico es fosfato de p-nitrofenilo, y la disolución de parada es una base.
- 30 58. El método según la reivindicación 57, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
59. El método según la reivindicación 56, en el que el ensayo es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- 35 60. El método según la reivindicación 56 ó 59, en el que el ensayo se selecciona del grupo que consiste en ensayo directo, indirecto y competitivo.
61. El método según la reivindicación 60, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
- 40 62. Uso de una composición para el uso en un ensayo ligado a enzimas y para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el ensayo, que comprende en una mezcla:
- 45 (a) un sustrato cromogénico seleccionado del grupo que consiste en orto-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), diaminobencidina (DAB), y 3,3'-dimetiloxibencidina (orto-dianisidina u ODN) que se convierte mediante una enzima en un recipiente de reacción para el ensayo a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda; y
- (b) un colorante indicador de pH que produce un segundo color detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada ácida o
- 50 básica a la composición en el recipiente de reacción;
- en el que las absorbancias a la primera y segunda longitudes de onda se miden espectrográficamente, en el que absorbancia a la primera longitud de onda indica detección del analito, absorbancia a la segunda longitud de onda indica una reacción negativa y una ausencia

de absorbancia a la primera y segunda longitudes de onda indica una reacción falsa negativa o detectar el segundo color a simple vista en el que el segundo color indica que la mezcla de reacción contiene la disolución líquida y la disolución de parada.

63. Uso según la reivindicación 62, en el que el sustrato cromogénico es fosfato de p-nitrofenilo.
- 5 64. Uso según la reivindicación 63, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en amarillo de alizarina R, carmín de índigo y combinaciones de los mismos.
65. Uso según la reivindicación 62, en el que el colorante indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de cresol, púrpura de m-cresol, amarillo de metanilo, 4-fenilazodifenilamina, verde de malaquita, naranja IV, 2,2',2'',4,4''-pentametoxitriifenil-carbinol y combinaciones de los mismos.
- 10 66. Uso de un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el inmunoensayo y en el que el inmunoensayo es para la detección colorimétrica de un analito de un tipo en el que se adsorbe una cantidad de un primer anticuerpo en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un reactivo inmunológico y una peroxidasa; se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el analito, el analito se une al primer anticuerpo y al conjugado para formar un complejo inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del analito midiendo la reacción del complejo inmunológico con un sustrato cromogénico oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, que comprende:
- 15
- (a) proporcionar una disolución líquida que comprende el sustrato cromogénico, peróxido, y un colorante indicador de pH, en la que el sustrato cromogénico es TMB u OPD y es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda cuando se forma una mezcla de reacción entre la disolución líquida y el complejo inmunológico y es oxidable adicionalmente del primer color a un segundo color con una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción y el colorante indicador de pH produce un tercer color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una tercera longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida;
- 20
- (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida el sustrato cromogénico al primer color;
- (c) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el segundo y tercer colores; y,
- 25
- (d) medir espectrográficamente las absorbancias a las primera, segunda y tercera longitudes de onda, en el que se detecta una reacción positiva mediante absorbancia a la segunda longitud de onda, reacciones que no tienen absorbancia a la primera o segunda longitud de onda, pero tienen absorbancia a la tercera longitud de onda se clasifican como negativas, y en el que todas las reacciones sin absorbancia a la tercera longitud de onda se clasifican como falsas negativas.
- 30
- 35 67. Uso de un inmunoensayo enzimático para distinguir una reacción negativa de una reacción falsa negativa en el inmunoensayo y en el que el inmunoensayo es para la detección colorimétrica de un anticuerpo de un tipo en el que se adsorbe una cantidad de un analito en un soporte sólido en un recipiente de reacción; se forma un conjugado entre un reactivo inmunológico y una peroxidasa; se mezcla el conjugado con una muestra que va a someterse a prueba para detectar el anticuerpo, el anticuerpo se une al analito y al conjugado para formar un complejo inmunológico en fase sólida; y se determina la cantidad del anticuerpo midiendo la reacción del complejo inmunológico con un sustrato cromogénico oxidable mediante peróxido y la peroxidasa, que comprende:
- 40
- (a) proporcionar una disolución líquida que comprende el sustrato cromogénico, peróxido, y un colorante indicador de pH, en la que el sustrato cromogénico es TMB u OPD y es oxidable a un primer color con una absorbancia a una primera longitud de onda cuando se forma una mezcla de reacción entre la disolución líquida y el complejo inmunológico y es oxidable adicionalmente del primer color a un segundo color con una absorbancia a una segunda longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción y el colorante indicador de pH produce un tercer color que es detectable a simple vista y tiene una absorbancia a una tercera longitud de onda cuando se añade una disolución de parada al recipiente de reacción que contiene la disolución líquida;
- 45
- (b) mezclar la disolución líquida con el complejo inmunológico en el recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción que oxida el sustrato cromogénico al primer color;
- 50
- (c) añadir la disolución de parada a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción para producir el segundo y tercer colores; y,
- 55

5

- (d) medir espectrográficamente las absorbancias a la primera, segunda y tercera longitudes de onda, en el que se detecta una reacción positiva mediante absorbancia a la segunda longitud de onda, reacciones que no tienen absorbancia a la primera o segunda longitud de onda, pero tienen absorbancia a la tercera longitud de onda se clasifican como negativas, y en el que todas las reacciones sin absorbancia a la tercera longitud de onda se clasifican como falsas negativas.

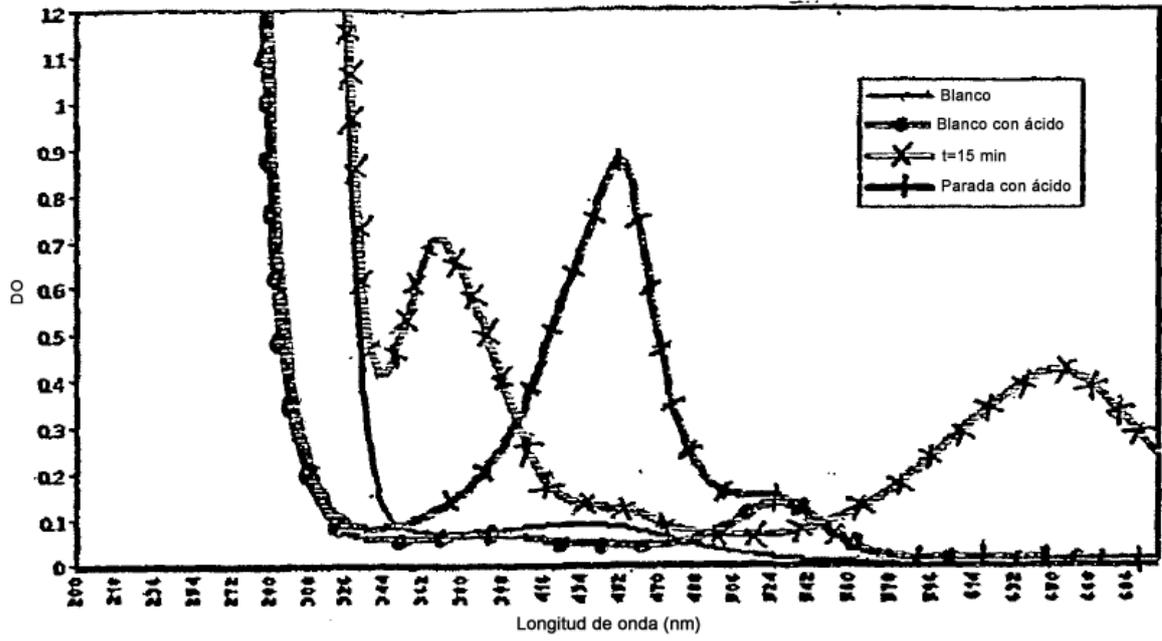


FIGURA 1