

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 765**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/52** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/558** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07700174 .1**  
96 Fecha de presentación: **19.01.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1982182**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **Nueva configuración de un dispositivo de tira reactiva seca y procedimiento para determinar un analítico en una muestra utilizando dicho dispositivo de tira reactiva seca**

30 Prioridad:  
**19.01.2006 DK 200600084**  
**19.01.2006 US 759953 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.06.2012**

73 Titular/es:  
**LATTEC I/S**  
**SLANGERUPGADE 69**  
**3400 HILLERÖD, DK**

72 Inventor/es:  
**CLAUSEN, Kim**

74 Agente/Representante:  
**García Egea, Isidro José**

ES 2 383 765 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**

5 Nueva configuración de un dispositivo de tira reactiva seca y procedimiento para determinar un analito en una muestra utilizando dicho dispositivo de tira reactiva seca.

**CAMPO DE LA INVENCION**

10 La presente invención se relaciona con el campo de dispositivos de tira reactiva seca y su uso para analizar un analito en una muestra. En concreto, la presente invención se relaciona con una configuración de un dispositivo de tira reactiva seca para la determinación de un analito en una muestra, en donde se han tenido en cuenta, en especial, la estabilidad del almacenado y la actividad del dispositivo de tira reactiva seca.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 La demanda de pruebas de diagnóstico rápidas y de fiar en el análisis clínico está creciendo. Hoy, partes significativas de las pruebas utilizadas en la analítica clínica en papeles para pruebas impregnados de diversos componentes, creando así un papel reactivo no diferenciado. Al usar dichos papeles para pruebas, el papel reactivo es, simplemente, puesto en contacto con el material que se analiza (por ejemplo, un fluido corporal) creando así un cambio en el color o un cambio en la intensidad del color que se usa para verificar si un efecto en concreto se consigue o no o para determinar cuantitativamente la cantidad de un analito presente en la muestra.

20 Actualmente, los procedimientos clínicos de laboratorio usados para el diagnóstico de las condiciones fisiológicas y nutricionales, tales como los diagnósticos de mastitis en un animal, se basan fundamentalmente en el recuento de células somáticas (RCS) de, por ejemplo, la leche y la diferenciación de patógenos bacterianos en muestras de leche.

25 Así, pruebas usadas de forma convencional para la detección de la inflamación provocada por mastitis en una animal han consistido, hasta ahora, en sistemas líquidos bastante complejos donde los tubos de ensayo, dispositivos de medición, luz ultravioleta, normalización de instrumentos, factores de corrección dependientes de la temperatura aumentan la incidencia de lecturas falsas.

30 La mastitis afecta la integridad de la estructura glandular mamaria y, al mismo tiempo, daña el epitelio secretor y las barreras sangre/leche. En consecuencia, muchos componentes de la leche están influenciados por la mastitis. Los componentes principales, tales como la grasa, la proteína y la lactosa son reducidos y un alto número de enzimas se ven alteradas.

35 Diferentes factores, distintos a la determinación de RCS, que pueden ser usados como indicadores adecuados para la inflamación provocada por la mastitis en un animal, pueden ser el lactato deshidrogenasa (LDH) y/o N-acetil glucosaminidasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, también llamada N-acetil glucosaminidasa (NAGasa), que ha sido considerada como uno de los mejores marcadores de la inflamación mamaria. Además, se ha mostrado que otras enzimas de la leche, como el LDH, puede ser de similar valor, en cuanto tanto esta enzima como la NAGasa pueden ser usadas como un indicador adecuado de la mastitis.

40 En el estado de la técnica, se han desarrollado un gran número de procedimientos para el análisis de analitos en muestras de líquido. Estos procedimientos puede ser clasificados, en sentido amplio, en dos clases de sistema, en concreto un sistema de reacción en el que la reacción se lleva a cabo en una solución (llamado también química húmeda) y un sistema de reacción en el que la reacción se lleva a cabo en un portador de fase sólida (también llamado química seca).

45 La reacción analítica basa en química húmeda incluye un gran número de procedimientos, que varían ampliamente desde un procedimiento analítico del así llamado procedimiento manual en el que no se usa ninguna máquina en absoluto para utilizar un instrumento analítico automático.

50 Sin embargo, tal química húmeda se lleva a cabo, fundamentalmente, en la forma de una solución acuosa, y exige algunas fases de tratamiento que implican diversos problemas. Un problema que puede darse hace referencia a la cantidad incrementada de agua presente, debido a lo cual puede provocarse un consumo incrementado de energía. Además, pueden necesitarse grandes habilidades para las operaciones necesarias para llevar a cabo el ensayo, necesiéndose así enormes cantidades de tiempo y trabajo, y los licores de desecho producidos pueden causar un polución medioambiental y, en consecuencia, exigir un tratamiento ulterior.

55 Por otro lado, los procedimientos analíticos que utilizan química seca para las reacciones analíticas han sido también ampliamente utilizados, y son, generalmente, practicados en forma de papel de filtro no diferenciado u otros materiales porosos impregnados con uno o más reactivos aptos para generar una señal detectable.

La patente US 3.867.259 (de Forgone) divulga un dispositivo de análisis diagnóstico (una tira reactiva seca) para determina la concentración de LDH en sueros. El dispositivo de análisis comprende un material absorbente con (i) una sal de tetrazolio (ii) un preventor de efectos cromatográficos (iii) un antioxidante, (iv) diaforasa y (v) un dinucleótido de nicotinamida y adenina.

5 Lippenheide et al. (1995) describen la medición de LDH en leche usando tanto química húmeda como seca. Lippenheide et al. concluyen con que la alta precisión, exactitud y facilidad de tratamiento se consiguen por el uso de un análisis de química seca en relación con análisis de química húmeda, sin embargo Lippenheide et al. no describen una configuración específica del dispositivo de tira reactiva seca. A pesar de las recomendaciones de  
10 Lippenheide et al., es un hecho que los dispositivos de tira reactiva seca disponibles hoy en día en el mercado y los dispositivos de tira seca reactiva descritos en el estado de la técnica (patente US 3.867.259, según se mencionó *supra*) consiste en un material no diferenciado impregnado con uno o más reactivo(s). Los dispositivos de tira seca reactiva que comprenden entornos no diferenciados comprometen tanto la estabilidad de almacenado y la puesta en práctica del/ de los reactivo(s) impregnado(s) como estabilidad óptima de almacenado son difícilmente conseguidos  
15 en las mismas condiciones de entorno (por ejemplo, pH y/o contenido de sal) como una realización óptima de la tira seca reactiva.

Así, por el uso de dispositivos de tira seca reactiva no diferenciada, el entorno del material, (esto es, tampón[es]) ha sido creado de tal forma que el dispositivo de tira seca reactiva muestra una estabilidad de almacenado aceptable (pero no óptima) y una puesta en práctica aceptable (pero no óptima).  
20

La patente US 3.901.657 divulga un dispositivo multicapa apto para la determinación colorimétrica de la presencia de un compuesto concreto en una solución de análisis. El dispositivo multicapa comprende al menos una capa más externa, opcionalmente una capa de barrera y una capa interna adyacente o bien a la capa de barrera o a la capa más externa. El dispositivo multicapa es un ensayo químico – usado para la determinación de morfina.  
25

La patente US 4.732.736 divulga un elemento analítico multicapa para detectar peróxido de hidrógeno. El elemento analítico multicapa comprende un material funcional de peroxidasa, un donante de hidrógeno y un acoplador, en donde el material funcional de peroxidasa y el donante de hidrógeno están dispuestos en diferentes capas de tal forma que se separan entre sí pero son aptos para interactuar cuando una muestra de líquido se aplica al elemento analítico. En el uso del elemento analítico, el donante de hidrógeno es usado por la Peroxidasa presente en el material funcional de peroxidasa.  
30

La patente US 4.959.305 divulga un dispositivo de análisis multizona para la determinación de un analito en un medio líquido de análisis. El análisis multizonal comprende una zona reactiva, una zona de reacción y una zona de detección – el análisis multizonal comprende un anticuerpo que se enlaza al analito etiquetado con un grupo químico detectable.  
35

La patente US 2004/219694 divulga un ensayo de enzima de flujo lateral y un equipo de análisis para la determinación de analito en una muestra de análisis. La invención se relaciona, ulteriormente, con un procedimiento de flujo lateral para la determinación de analitos por el uso directo del analito como un sustrato enzimático.  
40

La patente US 2005/260695 divulga compuestos, equipos y procedimientos útiles para la detección de mastitis en un animal. Estos agentes y procedimientos están destinados, fundamentalmente, a un procedimiento de detección de la presencia de mastitis, incluyendo mastitis sub-clínica, en vacas, comprendiendo la incubación de una muestra de leche de la vaca con un agente que se enlaza con la lactoferrina tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico para la lactoferrina, y, después, la detección de lactoferrina enlazada.  
45

La patente US 4.438.067 divulga un tira de análisis para la humidificación y la determinación colorimétrica leída de sustancias disueltas en líquidos. Estas tiras están compuestas de una base de apoyo inerte cubierta con una capa de cuentas de polímero a las cuales se incorporan los reactivos. La reacción de color tiene lugar en las propias cuentas, lo que mejora la sensibilidad y reproducibilidad del análisis.  
50

La patente US 4.454.094 divulga un indicador, destinado a la detección de al menos una sustancia de análisis en un medio de análisis, comprendiendo un portador y un sistema de reacción consistente en, al menos, un primer reactivo y un segundo reactivo, aplicados de forma separada sobre el portador, estando destinado dicho primer reactivo para desplazarse por difusión al segundo reactivo a través de una parte del portador, humedecida por el medio de análisis, mientras que reacciona con la sustancia de análisis. El indicador se caracteriza en que el primer reactivo se aplica en al menos una localización limitada, mientras que el segundo reactivo se aplica en al menos una localización, a una distancia que varía desde la localización del primer reactivo.  
55  
60

La patente FR 2.191.734 divulga un elemento analítico integral apto para ser usado en los análisis de líquidos, teniendo el elemento al menos dos capas superpuestas que incluyen una capa extensora y una capa reactiva, en contacto líquido.  
65

La patente US 2003/073073 divulga un procedimiento y un dispositivo inmuno-analítico para la detección rápida y simultánea de múltiples microorganismos en los líquidos biológicos de animales productores de leche que sufran de mastitis. Este procedimiento se basa en una técnica de inmunoensayo de flujo lateral llevada a cabo para detectar antígenos específicos para múltiples agentes infecciosos de los que se sabe que provocan y/o surgen en casos de mastitis.

Por tanto, puede ser de interés el proporcionar un dispositivo de tira reactiva seca, tal como un tira reactiva seca diferenciada, que exhibe, simultáneamente, una estabilidad de almacenado mejorada y una realización mejorada durante el ensayo en comparación con las convencionales producidas por dispositivos de tira reactiva seca.

En consecuencia, hay una necesidad de un dispositivo mejorado de tira reactiva seca tal como un dispositivo específico de tira reactiva seca en el que la estabilidad de almacenado y/o puesta en práctica del dispositivo de tira reactiva han sido considerablemente mejorados, proporcionando así unos entornos de tampón diferenciados, cada uno de ellos optimizados de tal forma que se mejore significativamente la estabilidad de almacenado y la puesta en práctica de los reactivo(s) y, por tanto, del dispositivo de tira reactiva seca. Esta necesidad ha sido satisfecha por la presente invención, que se explica más en detalle *infra*.

### **RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION**

De conformidad con lo anterior, el objeto de la presente invención es, en un primer aspecto, proporcionar un dispositivo mejorado de tira reactiva para la determinación de un analito en una muestra. Preferiblemente, el dispositivo mejorado de tira reactiva seca se relaciona con un dispositivo específico de tira reactiva para la determinación de un analito en una muestra.

La configuración del dispositivo de tira reactiva seca consisten en, al menos, un tampón reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos apto(s) para reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito con objeto de proporcionar una señal detectable estando en un estado húmedo. El, al menos, un tampón reactivo proporciona un primer entorno para el/los reactivo(s), permitiendo, por tanto, una estabilidad de almacenado mejorada del/ de los reactivo(s) y del dispositivo de tira reactiva seca cuando esté en un estado no húmedo. Además, el dispositivo de tira reactiva seca consiste de un tampón regulador, que está en contacto con el, al menos, un tampón reactivo. El tampón reactivo crea un segundo entorno para el/los reactivo(s) cuando se esté en un estado húmedo, permitiendo, en consecuencia, un índice incrementado de reacción entre el analito y los reactivos cuando se esté en un estado húmedo. En el uso, la muestra de la que se sospeche que contenga el analito se aplica al, al menos, un tampón reactivo del dispositivo de tira reactiva seca. La muestra se desplaza al interior del, al menos, un tampón reactivo y solubiliza el/los reactivo(s) y, así, sólo o conjuntamente con el/los reactivo(s) se desplaza del, al menos, un tampón reactivo al interior del tampón regulador, que está en contacto con el, al menos, un tampón reactivo. El tampón regulador crea, estando en un estado húmedo, un segundo entorno, permitiendo un índice incrementado de reacción entre el analito y los reactivos, permitiendo así que reactivo y el analito, el derivado de dicho analito o el compuesto detectable de dicho analito proporcionen una señal detectable que, directa o indirectamente, pueda ser observada, bien por medio de un instrumento o dispositivo adecuado o por inspección visual.

En un aspecto de la presente invención, el dispositivo comprende:

- (i) Opcionalmente, un soporte sólido,
- (ii) Al menos un tampón reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos apto(s) para reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho para dicho analito para proporcionar una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad mejorada de almacenado del/ de los reactivo(s) y dispositivo de tira reactiva cuando se esté en un estado no húmedo.
- (iii) Un tampón regulador que esté en contacto con el, al menos, un tampón reactivo, creando el tampón reactivo un segundo entorno para dicho(s) reactivo(s) cuando se esté en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre el analito y el/los reactivo(s), y

En donde la muestra se aplica a una superficie del dispositivo de tira reactiva seca y la señal detectable se detecta sobre la misma y en el que la determinación del analito se basa en una determinación basada en enzimas y en la que las condiciones del primer entorno vienen dadas por el ajuste del valor de pH a un valor que se desvía del valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en el que las condiciones del segundo entorno vienen dadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor óptimo de pH de la/s enzima(s) y en el que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para ensayar un analito en una muestra de leche. El procedimiento comprende las etapas de

- (i) Aplicar la muestra de leche de la que se sospecha que contiene el analito a un tampón reactivo
- 5 (ii) Permitir que la muestra se desplace al tampón reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos aptos para reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad mejorada de almacenado del/ de los reactivo(s) y dispositivo de tira reactiva seca estando en un estado no húmedo
- 10 (iii) Permitir a la muestra, sola o conjuntamente con el reactivo, desplazarse desde el tampón reactivo a un tampón regulador, estando dicho tampón regulador en contacto con el tampón reactivo, creando el tampón regulador un segundo entorno para dicho reactivo estando en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre el analito y el reactivo, y
- 15 (iv) Permitir al reactivo y al analito, el derivado de dicho analito o el compuesto indicador para dicho analito que proporcionen una señal detectable, y en la que la determinación del analito se basa en una determinación basada en enzimas y en la que las condiciones del primer entorno son determinadas por el ajuste del valor de pH a un valor que se desvía del valor de pH óptimo de la(s) enzima(s) y en la que las condiciones del segundo entorno están determinadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en la que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH,
- 20

En aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema para la preparación del dispositivo de tira reactiva seca de acuerdo con la presente invención. El procedimiento comprende las etapas de:

- 25 (i) Proporcionar un tampón reactivo por la impregnación de un primer material poroso con una solución acuosa que comprende un reactivo o una combinación de reactivos capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad mejorada de almacenado del/ de los reactivo(s) y dispositivo de tira reactiva seca
- 30 (ii) Secar, por tanto, el tampón reactivo,
- (iii) Proporcionar un tampón regulador por la impregnación de un segundo material poroso con una solución acuosa, creando un segundo entorno para dicho(s) reactivo(s) estando en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno una índice incrementado de reacción entre el analito y el reactivo,
- 35 (iv) Secar, por tanto, el segundo material poroso impregnado, y
- (v) Poner en contacto el tampón reactivo con el tampón regulador, opcionalmente sobre un soporte sólido, para obtener la tira reactiva seca, y

40 En donde la tira reactiva seca se basa en una determinación con base en enzimas y en la que las condiciones del primer entorno vienen dadas por el ajuste del valor de pH a un valor que se desvía del valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en el que las condiciones del segundo entorno vienen dadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en el que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH.

45 La presente invención será descrita en más detalle *infra*.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION**

50 Los inventores de la presente invención descubrieron por sorpresa y desarrollaron una nueva configuración de dispositivo de tira reactiva seca que cumpla al mismo tiempo con las exigencias de buena estabilidad durante el almacenado y buena ejecución durante el análisis o ensayo. Este dispositivo de tira reactiva seca puede tener la constitución de un dispositivo diferenciado de tira reactiva seca.

55 En el contexto actual, el término "diferenciado" se relaciona con un dispositivo de tira reactiva seca con diferentes entornos (por ejemplo, diferentes valores de pH) en la misma tira reactiva seca. Estos diferentes entornos participan en la mejora de la estabilidad de almacenado de los reactivos impregnados y la tira reactiva seca además de en la mejora del índice de reacción de la tira reactiva seca cuando se ensaya el analito. El término "no-diferenciado" se relaciona, por otro lado, con un dispositivo de tira reactiva seca que comprende sólo un entorno en el que se almacena/n el/los diferente/s reactivo(s).

60

65 La constitución del nuevo dispositivo de tira reactiva seca para la determinación de un analito en una muestra comprende: (i) opcionalmente, un soporte sólido, (ii) Al menos un tampón reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos apto(s) para reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho para dicho analito para proporcionar una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s),

5 permitiendo dicho primer entorno una estabilidad mejorada de almacenado del/ de los reactivo(s) y dispositivo de tira seca reactiva cuando se esté en un estado no húmedo (iii) Un tampón regulador que esté en contacto con el, al menos, un tampón reactivo, creando el tampón reactivo un segundo entorno para dicho(s) reactivo(s) cuando se esté en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre el analito y el/los reactivo(s), y en donde la muestra se aplica a una superficie del dispositivo de tira reactiva seca y la señal detectable se detecta sobre la misma y en el que la determinación del analito se basa en una determinación basada en enzimas y en la que las condiciones del primer entorno vienen dadas por el ajuste del valor de pH a un valor que se desvía del valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en el que las condiciones del segundo entorno vienen dadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor óptimo de pH de la/s enzima(s) y en el que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH.

15 Puede preferirse que el procedimiento y el dispositivo de la presente invención para la determinación del analito esté basado en una determinación con base en enzimas. La actividad de las enzimas es intensamente afectada, por ejemplo, por los cambios en el pH del entorno que las rodea. Con respecto a la dependencia de pH, se sabe generalmente que cada enzima trabaja mejor en un cierto pH (el pH óptimo de la enzima) y que su actividad decrece en valores por encima y por debajo de este punto, pero, a determinado nivel, habrá una actividad de la enzima en valores de pH que se desvían de este pH óptimo. Adicionalmente, se sabe por el experto en la materia que este pH óptimo es diferente de una enzima a otra y el intervalo entre los diferentes valores óptimos de pH puede ser grande. Por ejemplo, el pH óptimo normal para la mayoría de las enzimas humanas está entre pH 6 y 8, sin embargo, la enzima pepsina que digiere las proteínas, secretada en el estómago solamente es activa en un medio ácido y tiene un pH óptimo en pH 2, mientras que el valor de pH óptimo para tripsina, una enzima que divide las proteínas secretadas desde el páncreas, tiene un pH óptimo en pH 8.5. En consecuencia, puede ser de interés durante el ensayo el proporcionar un valor de pH que esté tan próximo al pH óptimo de la enzima del ensayo tanto como sea posible para obtener una reacción rápida.

30 En la presente invención, el término "primer entorno" se relaciona con unas condiciones alrededor del reactivo o la combinación de reactivos en el tampón reactivo estando en un estado no húmedo en el que la reactividad del reactivo o combinación de reactivos está disminuida con respecto a la reactividad bajo condiciones óptimas (también en un estado no húmedo). Es obvio que estas condiciones son diferentes dependiendo de la enzima que esté presente y/o de la enzima que sea determinada como el analito. Las condiciones óptimas son conocidas por el experto en la materia y pueden ser encontradas en el estado de la técnica. En una realización preferida de la presente invención, las condiciones del primer entorno pueden ser obtenidas por la regulación del valor de pH hasta un valor diferente del valor óptimo de pH del/ de las enzima(s), por ejemplo, por la eliminación de un ácido o de una base.

40 En una realización preferida de la presente invención, las condiciones del primer entorno pueden ser seleccionadas de tal forma que favorezcan la estabilidad de almacenado del/ de los reactivo(s) aptos para reaccionar con el analito para obtener una señal detectable.

45 El tiempo de almacenado para el dispositivo de tira reactiva seca de acuerdo con la presente invención puede ser extendido, de forma sustancial, debido a la nueva constitución del dispositivo de tira reactiva seca. El tiempo de almacenado extendido, tal y como se divulga en la presente invención, se relaciona con un tiempo de almacenado más amplio sin una pérdida significativa de eficacia durante el ensayo. Así, el tiempo de almacenado del dispositivo de tira seca reactiva, de acuerdo con la presente invención, puede ser de al menos un 15 % más amplio que el de una tira reactiva seca similar, desarrollada en forma convencional, tal como un 20 % más amplio, un 50 % más amplio, por ejemplo un 75 % más amplio, tal como un 100 % más amplio, por ejemplo, un 150 % más amplio, tal como un 200 % más amplio, por ejemplo un 300 % más amplio o tal como un 500 % más amplio.

50 En una realización de la presente invención, las condiciones del primer entorno vienen dadas por el ajuste del valor de pH a un valor que se desvía del valor de pH óptimo del/ de las enzima(s). Preferiblemente, la desviación del óptimo puede ser de al menos 0.5 unidades de pH, por ejemplo al menos 1 unidad de pH, tal como al menos 1.25 unidades de pH, por ejemplo, al menos 1.5 unidades de pH, tal como al menos 1.75 unidades de pH, por ejemplo, al menos 2 unidades de pH, tal como al menos 2.5 unidades de pH, por ejemplo, al menos 3 unidades de pH, tal como al menos 3.5 unidades de pH, por ejemplo, al menos 4 unidades de pH, tal como al menos 4.5 unidades de pH o, por ejemplo, al menos 5 unidades de pH.

60 En la presente invención, el término "segundo entorno" se relaciona con unas condiciones en el dispositivo de tira reactiva seca alrededor del reactivo o de la combinación de reactivos dadas por el tampón regulador estando en un estado húmedo en el que la reactividad del reactivo o de la combinación de reactivos (impregnado(s) inicialmente en el, al menos, un tampón reactivo) se acerca a las condiciones óptimas de la(s) enzima(s) con objeto de mejorar la reactividad de las enzimas. Esto quiere decir que el tampón reactivo es proporcionado para introducir un cambio en el dispositivo de tira reactiva seca que lleva a los reactivos y/o el analito desde un estado sustancialmente inactivo o de un estado de actividad reducida a un estado de actividad incrementada capaz de proporcionar una determinación del analito fiable, reproducible y sencilla.

De nuevo, es obvio que las condiciones óptimas son diferentes dependiendo de la enzima presente y/o la enzima determinada como analito, y que las condiciones óptimas son conocidas por el experto en la materia y pueden ser encontradas en el estado de la técnica. En una realización preferida de la presente invención, las condiciones del segundo entorno pueden venir dadas por la regulación del valor de pH a un valor próximo al valor de pH óptimo de la(s) enzima(s), por ejemplo, por la adición de un añadido o una base.

En una realización preferida de la presente invención, las condiciones del segundo entorno se seleccionan de tal forma que se favorezca la realización de la reactividad del/ de los reactivo(s) aptos para reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable o de tal forma que se favorezca el índice de reacción entre el analito y el/los reactivo(s) aptos para reaccionar con el analito proporcionando una señal detectable.

En otra realización de la presente invención, las condiciones del segundo entorno vienen dadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor de pH óptimo del/ de las enzima(s). Preferiblemente, el valor de pH se desvía del valor de pH óptimo en menos de 2 unidades de pH, tal como menos de 1 unidad de pH, por ejemplo menos de 0.75 unidades de pH, tal como menos de 0.5 unidades de pH, por ejemplo menos de 0.25 unidades de pH, tal como al menos 0.25 unidades de pH, tal como menos de 0.1 unidades de pH, o, por ejemplo, menos de 0.05 unidades de pH.

En otra realización de la presente invención, las condiciones del segundo entorno vienen dadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor de pH óptimo del/ de las enzima(s). Preferiblemente, el valor de pH se desvía del valor de pH óptimo en menos de 2 unidades de pH, tal como menos de 1 unidad de pH, por ejemplo menos de 0.75 unidades de pH, tal como menos de 0.5 unidades de pH, por ejemplo menos de 0.25 unidades de pH, tal como al menos 0.25 unidades de pH, tal como menos de 0.1 unidades de pH, o, por ejemplo, menos de 0.05 unidades de pH.

Cuando el ensayo implica dos o más enzimas con diferentes óptimos, el segundo entorno puede desviarse de las condiciones óptimas con objeto de considerar que todas enzimas que participan en el ensayo favorecen el ensayo del analito. En una realización de la presente invención, la desviación del valor de pH óptimo puede ser de menos de 2 unidades de pH, tal como menos de 1 unidad de pH, por ejemplo menos de 0.75 unidades de pH, tal como menos de 0.5 unidades de pH, por ejemplo menos de 0.25 unidades de pH, tal como al menos 0.25 unidades de pH, tal como menos de 0.1 unidades de pH, o, por ejemplo, menos de 0.05 unidades de pH.

En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento y el dispositivo descrito una determinación de un analito basada en enzimas. Esto incluye los tipos de ensayos donde uno o más enzima(s) es/ son impregnado(s) en el, al menos, un tampón reactivo y el analito puede ser o no una enzima. Sin embargo, la determinación de un analito basada en enzimas también se relaciona con ensayos en donde el analito que va a ser determinado es una enzima con independencia de la presencia o no de una enzima que sea impregnada en el tampón reactivo. Se prefiere que el ensayo sea uno en el que una enzima se impregne en el, al menos, un tampón reactivo y el analito pueda ser o no una enzima.

Los inventores de la presente invención han divulgado también un nuevo procedimiento para ensayar un analito en una muestra de leche. El procedimiento comprende las etapas de:

- (i) Aplicar la muestra de leche, de la que se sospeche que contiene el analito, a un tampón reactivo
- (ii) Permitir que la muestra se desplace al tampón reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos aptos para reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad mejorada de almacenado del/ de los reactivo(s) y dispositivo de tira reactiva seca estando en un estado no húmedo
- (iii) Permitir a la muestra, sola o conjuntamente con el reactivo, desplazarse desde el tampón reactivo a un tampón regulador, estando dicho tampón regulador en contacto con el tampón reactivo, creando el tampón regulador un segundo entorno para dicho reactivo estando en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre el analito y el reactivo, y
- (iv) Permitir al reactivo y al analito, el derivado de dicho analito o el compuesto indicador para dicho analito que proporcionen una señal detectable, y en la que la determinación del analito se basa en una determinación basada en enzimas y en la que las condiciones del primer entorno son determinadas por el ajuste del valor de pH a un valor que se desvía del valor de pH óptimo de la(s) enzima(s) y en la que las condiciones del segundo entorno están determinadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en la que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH,

La señal detectable puede ser cualquier sustancia que sea, directa o indirectamente, capaz de ser observada por cualquier clase de medio visual o instrumental. El medio instrumental puede ser, por ejemplo, un magnetómetro, un espectrofotómetro, o un lector de ELISA. Diversos compuestos pueden ser adecuados para ser el compuesto productor de color. En la presente invención, el compuesto productor de color puede ser

seleccionado del grupo consistente en cromógenos, catalistas, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, etiquetas radioactivas, metales, partículas magnéticas, partículas tintóreas, enzimas o sustratos, o partículas de látex de polímero orgánico; liposomas u otras vesículas que contengan sustancias productoras de señal y similares.

La muestra que va a ser ensayada puede ser aplicada al dispositivo de tira reactiva seca bien por aplicación de la muestra o de un subconjunto de la muestra al dispositivo de tira reactiva seca o poniendo la tira reactiva seca en el interior de un recipiente que contenga la muestra. En la etapa (i) se sugiere aplicar la muestra de la que se sospecha que contiene el analito, o un subconjunto de la misma, al tampón reactivo.

Alternativamente, la muestra sospechosa de contener el analito, o un subconjunto del mismo puede ser aplicada a un segundo tampón de aplicación que sea capaz de recibir y distribuir la muestra (sustancialmente homogénea, preferiblemente) en el tampón reactivo y el tampón de regulación, respectivamente.

En el presente contexto, el término “tampón de aplicación” se refiere a un tampón en el dispositivo donde la muestra líquida se aplica al mismo y que proporciona una rápida absorción de la muestra líquida y una liberación rápida y consistente de una muestra al tampón reactivo y/o al tampón regulador. Consecuentemente, el material usado en el tampón de aplicación puede ser seleccionado del grupo consistente de una membrana de nitrocelulosa, una celulosa, un polímero como el nylon, un fluoruro de polivinilo o látex, fibras de vidrio, fibras tejidas, fibras no tejidas y una membrana de gel cromatográfico. Preferiblemente, el material usado en el primer entorno es una fibra de vidrio tejida o no.

Cuando una muestra se aplica al tampón de aplicación, se desplaza al tampón reactivo y/o regulador (fases (ii) y (iii) en las respectivas construcciones) transformando, así, el primer y segundo entorno en estados húmedos. En el presente contexto, el término “en estado húmedo” hace referencia al contacto entre reactivo(s) en el tampón de reactivo(s) y/o el agente en el tampón regulador y la muestra, con lo que el tampón de reactivo(s) y/o el tampón regulador se humedecen o humedecen ligeramente. El efecto del estado húmedo es que los reactivos secos, los químicos secos y/o componentes secos son liberados y disueltos (movilizados) y la reacción en la tira reactiva seca se inicia y se produce una señal detectable, dependiente de la cantidad de analito presente en la muestra. En una realización de la presente invención, el tampón de aplicación se hace parte del tampón reactivo y/o el tampón regulador.

#### El material poroso

Los materiales seleccionados para su uso en el, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador puede ser seleccionados de un material poroso. En el presente contexto, el término “material poroso” se refiere a un material que absorbe la muestra y, en consecuencia, le permite desplazarse. El material poroso seleccionado puede suponer unas dimensiones de poro que tenga una capacidad que haga posible proporcionar un algo índice de flujo que disuelva rápidamente el reactivo o la combinación de reactivos y que proporciona una distribución buena y sustancialmente igualitaria de las muestras. Preferiblemente, el material poroso puede ser seleccionado para proporcionar, sustancialmente, muestras enriquecidas por una ausencia de retención de triglicéridos. En una realización de la presente invención, la retención de triglicéridos es de 0 %, tal como, de máximo, 1 %, por ejemplo, un máximo de 2,5 %, tal como un 5 % de máximo, por ejemplo, un máximo de 10 %, tal como 15% de máximo, por un ejemplo, un 25 % de máximo, tal como un 50 % de máximo, o la retención de la mayoría o de la totalidad de los triglicéridos, por ejemplo, en un máximo de 75 %, tal como el máximo de 100 %.

El material poroso se selecciona preferiblemente del grupo consistente de una membrana de nitrocelulosa, una celulosa, un polímero, tal como nylon, un fluoruro de polivinilideno o látex, fibras de vidrio, fibras tejidas, fibras no tejidas, membranas de gel cromatográfico, tierra de diatomeas, gel de sílice, óxido de silicio y kieselgur.

En una realización de la presente invención, el material poroso en el, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador, puede ser seleccionado de un grupo de materiales que comprende unas dimensiones de poro que estén, preferiblemente, en el intervalo de 10-30.000  $\mu\text{m}$ , tal como en el intervalo de 10-20.000  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de 10-10.000  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de 10-1000  $\mu\text{m}$ , tal como en el intervalo de 10-500  $\mu\text{m}$ , tal como en el intervalo de 10-100  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de 10-75  $\mu\text{m}$ , tal como en el intervalo de 10-50  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo 50-200  $\mu\text{m}$ , tal como el intervalo de 50-100  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de 100-500  $\mu\text{m}$ , tal como en el intervalo de 50-300  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de 75-300  $\mu\text{m}$ , tal como el intervalo de 75-200  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de 75-150  $\mu\text{m}$ , tal como en el intervalo de 75-120  $\mu\text{m}$ .

En una realización tal de la presente invención, el material poroso del, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador pueden ser seleccionados de un grupo de materiales que conlleven unas dimensiones de poro de, como máximo, 500  $\mu\text{m}$ , por ejemplo como máximo 200  $\mu\text{m}$ , tal como, como máximo, 150  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, como máximo 100  $\mu\text{m}$ , tal como, como máximo, 75  $\mu\text{m}$ .

En otra realización de la presente invención, el material poroso en el, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador, pueden estar caracterizados por tener una alta capacidad de unir proteínas tal como en el intervalo de 1-

400  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo el intervalo de 1-250  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como en el intervalo de 1-200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo el intervalo de 1-140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como el intervalo de 1-120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo el intervalo de 1-100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como el intervalo de 1-80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo el intervalo de 1-60  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como el intervalo 1-40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo el intervalo de 50-200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como el intervalo de 50-100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo el intervalo de 50-150  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como el intervalo de 50-120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo el intervalo de 75-120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como el intervalo de 75-110  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

En una realización ulterior de la presente invención, el material poroso en el, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador puede estar caracterizado por tener una alta capacidad de unir proteínas tal como, como máximo 400  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo como máximo 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como, como máximo, 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo como máximo 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo como máximo 120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo como máximo 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como máximo 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo como máximo 60  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como, como máximo, 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Consecuentemente, en una realización de la presente invención, el material poroso en el, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador puede caracterizarse por permitir que la muestra se desplace con un alto índice de flujo capilar, tal como en el intervalo de 50-500  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , por ejemplo el intervalo de 50-250  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como el intervalo de 50-200  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como el intervalo de 50-100  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , por ejemplo el intervalo de 50-75  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como el intervalo de 100-250  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , por ejemplo el intervalo de 150-250  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como el intervalo de 200-250  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , y, por ejemplo, el intervalo de 250-500  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como el intervalo de 75-150  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , y, por ejemplo, el intervalo de 80-130  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como el intervalo de 80-110.

En otra realización de la presente invención, el material poroso del, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador, puede caracterizarse por permitir que la muestra se desplace con un alto índice de flujo capilar, tal como, como máximo, 300  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , por ejemplo como máximo de 200  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como, como máximo, 100  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$ , tal como, como máximo, 75  $\text{sec}/4 \text{ cm.}$

Preferiblemente, los materiales porosos usados en el, al menos, un tampón reactivo y/o el tampón regulador pueden ser los mismos en al menos 2 de los tampones, tal como en al menos 3 de los tampones, por ejemplo 4 de los tampones, tal como al menos 5 de los tampones.

De acuerdo con el material poroso *supra*, puede ser deseable proporcionar un dispositivo para detectar un analito en un ensayo rápido. En una realización de la presente invención, el tiempo de ensayo es de menos de 15 minutos, tal como menos de 10 minutos, por ejemplo menos de 8 minutos, tal como menos de 7 minutos, por ejemplo menos de 6 minutos, tal como menos de 5 minutos, por ejemplo menos de 4 minutos, tal como menos de 3 minutos, por ejemplo menos de 2 minutos, tal como menos de 1 minuto, por ejemplo menos de 30 segundos.

#### El tampón reactivo

En el presente contexto, el término "tampón reactivo" se refiere a uno o más tampones que comprenden un reactivo o una combinación de reactivos. El reactivo o la combinación de reactivos pueden, preferiblemente, estar impregnados en el tampón reactivo de tal forma que el reactivo o la combinación de reactivos esté/estén inmovilizados cuando estén en estado seco y móviles cuando estén en estado húmedo.

En el presente contexto, de la presente invención, el término "reactivo" se refiere a la sustancia química o una enzima que reacciona con o participa en o es necesaria para la determinación de un analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable. Puede proporcionarse una definición similar de la combinación de reactivos, que se refiere, de forma más concreta, a 2 ó más reactivos, tal como 3 ó más reactivos, por ejemplo 4 ó más reactivos, tal como 5 ó más reactivos, por ejemplo 6 ó más reactivos.

En una realización de la presente invención, el dispositivo de análisis de tira reactiva seca comprende al menos 2 tampones reactivos, tal como al menos 3 tampones reactivos, por ejemplo al menos 4 tampones reactivos, tal como al menos 5 tampones reactivos, por ejemplo 6 tampones reactivos. En esta realización, los reactivos que reaccionan con o participan en o son necesarios para la determinación de un analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable, pueden ser introducidos en diferentes tampones reactivos. Esto puede mejorar la estabilidad, las propiedades de almacenado y la aplicabilidad de la tira seca reactiva ya que pueden ser incluidos compuestos no compatibles en diferentes tampones reactivos y, por ello, diferentes entornos del dispositivo de tira seca reactiva.

#### El tampón regulador

En el presente contexto, el término "tampón regulador" se refiere a un tampón capaz de regular el entorno de la muestra que comprende el analito hasta alcanzar un segundo entorno para la muestra con objeto de facilitar la determinación del analito, un derivado del mismo o un compuesto indicador para el mismo.

En una realización de la presente invención, el tampón regulador puede comprender uno o más agentes aptos para incrementar el grado de reacción. Tales agentes proporcionan un cambio en el pH por la adición de un ácido, una base o por una combinación de los mismos.

5 En una realización ulterior de la presente invención, el tampón regulador está en contacto con al menos un tampón reactivo por una superposición sustancialmente completa, por una superposición parcial o permaneciendo de forma adyacente al, al menos, un tampón reactivo. En una realización de la presente invención, el tampón regulador está sobreponiéndose al, al menos, un tampón reactivo en al menos 5 %, tal como al menos 10 %, por ejemplo al menos 25 %, tal como al menos 50 %, por ejemplo al menos 75 %, tal como al menos 80 %, por ejemplo al menos 90 %, tal como al menos 95 %. En el presente contexto, el término “superposición sustancialmente completa” hace referencia a dos tampones independientes (el tampón regulador y el, al menos, un tampón reactivo) que están ubicados uno encima de otro. En el presente contexto, el término “superposición parcial” se refiere a dos tampones independientes (el tampón regulador y el, al menos, un tampón reactivo), superponiéndose con sólo parte del/de los tampón(es). Una superposición parcial de 100 % se refiere a una superposición completa y una desviación del 5 % del 100 % de la superposición completa se refiere a una superposición sustancialmente completa.

20 En una realización de la presente invención, el tampón regulador y el, al menos, un tampón(es) reactivo/s permanecen adyacentes entre sí. Esto significa que los tampones están situados en contacto entre sí (rozándose entre sí). Una superposición del 0 % (pero estando en contacto) se refiere al término “permanecer adyacente”; ulteriormente, una superposición de menos del 5 % puede ser considerada como incluida en el término de “permanecer adyacente”, tal como una superposición de, como máximo, 4 %, por ejemplo, una superposición de, como máximo, 3 %, tal como una superposición de, como máximo, 2 % o, por ejemplo, una superposición de, como máximo, 1 %.

25 En otra realización ulterior de la presente invención, el tampón de regulación y el, al menos, un tampón reactivo pueden ser combinados en un tampón en donde el/los reactivo(s) y el/los agente(s) capaces de incrementar el grado de la reacción pueden ser impregnados de forma individual y pueden estar opcionalmente separados por un revestimiento. En la patente US4.215.995 se han descrito un sistema, un procedimiento y diversos productos químicos útiles para la preparación de un tampón que comprenda todas las sustancias (reactivo(s) y agente(s) capaces de incrementar el grado de la reacción) en un tampón.

30 En una realización de la presente invención, se pueden incorporar uno o más reactivos en el tampón regulador, en el que el/los reactivo(s) sensible(s) al segundo entorno, a la composición química o a los reactivos del ensayo pueden ser trasladados a un tampón independiente, por ejemplo, el tampón reactivo.

35 El soporte sólido

40 El dispositivo de acuerdo con la presente invención, puede estar apoyado en un soporte sólido. En el presente contexto, el término “soporte sólido” se refiere a un material, que no tiene influencia sobre el desplazamiento o sobre la reacción de la muestra líquida o sobre el/los reactivo(s) o los agentes capaces de incrementar el grado de la reacción. El soporte sólido proporciona una base de estabilización para el dispositivo de ensayo y proporciona la fuerza suficiente para mantener la forma física deseada y no interfiere, sustancialmente, con la producción de una señal detectable.

45 En una realización de la presente invención, el material para el soporte sólido se selecciona del grupo consistente en tubos, cuentas de masa polimérica, bandas de nitrocelulosa, membranas, filtros, hojas de plástico y similares.

50 Naturalmente, los materiales sintéticos y los que se dan de forma natural y que son modificados sintéticamente, pueden ser usados como material de la fase sólida. Tales materiales incluyen polisacáridos, por ejemplo materiales de celulosa como el papel y derivados de celulosa, como el acetato de celulosa y la nitrocelulosa, sílice, materiales inorgánicos, tales como, por ejemplo, alúmina desactivada, tierra diatomácea,  $MgSO_4$  u otro material sutilmente dividido dispersado en una matriz polimérica porosa, en donde la matriz puede comprender uno o más polímeros tales como homopolímeros y copolímeros de cloruro de vinilo, por ejemplo, cloruro de polivinilo, cloruro de vinilo – copolímero de propileno, y cloruro de vinilo – copolímero de acetato de vinilo, paño, ambos de los que se dan de forma natural (por ejemplo, el algodón) y sintética (por ejemplo, el nylon), geles porosos, tales como gel de sílice, agarosa, dextrano, y gelatina, películas poliméricas, tales como poliacrilamida, y similares.

55 En una realización de la presente invención, se puede prescindir del soporte sólido del dispositivo de tira seca reactiva. En este caso, el dispositivo de tira seca comprende al menos un tampón reactivo y un tampón regulador. Cuando se lleva a cabo una determinación de un analito en una muestra usando un dispositivo de tira seca reactiva sin un soporte sólido, la muestra puede ser aplicada a la tira seca reactiva de una superficie y la señal detectable ser detectada en la misma o en otra superficie del dispositivo.

60 Analitos a determinar

65

Un dispositivo o procedimiento basado en los principios *supra*, puede ser usado para determinar una amplia gama de analitos por elección de unos compuestos de coloración apropiados conocidos por el experto en la materia, y la invención no tiene por qué estar limitada a los ejemplos aquí mencionados.

5 En una realización de la presente invención, los analitos que van a ser ensayados pueden ser seleccionados del grupo consistente en una proteína, una enzima, una grasa, un hidrato de carbono, un antibiótico, un esteroide, tales como hormonas, una vitamina, un compuesto químico, un hapteno, una célula, tal como una bacteria o tal como leucocitos, un anticuerpo, una droga de abuso y sangre.

10 En una realización de la presente invención, el analito es una enzima y la enzima es seleccionada, preferiblemente, del grupo consistente en catalasa, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, carboxilesterasas, arilesterasa,  $\beta$ -glucuronidasa, lactoperoxidasa, lipasa, lisozima, xantina oxidasa, plasminógeno, beta-N-acetilhexosaminidasa, (NAGasa), prostaglandina D sintasa (PGDS).

15 En otra realización alternativa de la presente invención, el analito es un compuesto químico y el compuesto químico puede ser seleccionado del grupo consistente en urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tales como acetoacetato, beta-hidroxi-butilato (BOHB), acetona, ácido ascórbico, nitratos, urobilinógeno, colesterol, y esteroides tales como pregnenolona, progesterona, testosterona, dihidrotestosterona, estrona, estradiol, cortisol, cortisona, aldosterona, corticosterona, androstenediona,  $17\alpha$ -OH-progesterona, 11-desoxi-corticosterona, 11-desoxicortisol y dehidroepiandrosterona, hormona luteinizante o gonadotropina coriónica humana.

20 En una realización ulterior de la presente invención, el analito es un carbohidrato y el carbohidrato puede ser seleccionado del grupo consistente de un monosacárido, tal como glucosa o galactosa, y un disacárido, tal como la lactosa.

25 Las muestras a analizar

En el presente contexto, el término “una muestra” se refiere a cualquier muestra encontrada en forma líquida, sólida o gaseosa, y que puede ser licuada en el momento del ensayo. Con objeto de humedecer el material poroso usado en el tampón regulador y/o en el, al menos, un tampón reactivo para permitir el desplazamiento, puede ser aplicada una muestra líquida. Además, se prefiere que sea necesario un número mínimo de etapas de manejo de la muestra líquida antes de su aplicación al dispositivo de prueba de tira reactiva seca. En el presente contexto, el término “etapas de manejo” se refiere a cualquier tipo de pre – tratamiento de la muestra líquida antes o después de que haya sido aplicada al dispositivo de ensayo. Este pre – tratamiento comprende separación, filtrado, dilución, destilación, concentración, inactivación de compuestos que interfieren, centrifugación, calentamiento, fijación, adición de reactivos, o tratamiento químico.

35 En una realización de la presente invención, la muestra puede ser recogida de un mamífero, preferiblemente el mamífero se selecciona del grupo consistente en animales gregarios, vacas, camellos, búfalos, cerdos, caballos, ciervo, oveja, cabras, mascotas, perros, gatos y humanos.

40 En una realización preferida de la presente invención, la muestra puede ser derivada de cualquier fuente que se desee, aunque, sin embargo, se prefiere que la muestra sea seleccionada del grupo consistente de leche, sangre, suero, plasma, saliva, orina, sudor, líquido lenticular ocular, líquido espinal cerebral, líquido de ascitis, líquido mucoso, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico o similares.

45 Además de líquidos fisiológicos, pueden ser usadas otras muestras de líquidos, como muestras variadas de agua, productos alimenticios, agua de desecho y similares. Adicionalmente, una muestra sólida de prueba puede ser usada una vez que es modificada para formar una muestra líquida, por ejemplo, en forma de una solución, una suspensión o una emulsión.

El compuesto colorante

50 En el presente contexto, el término “compuesto colorante” se refiere a un compuesto químico apto para desarrollar y emitir una señal detectable, tal como producir un color. La intensidad de este color varía dependiendo de la concentración del analito presente en la muestra.

60 Ejemplos de compuestos colorantes adecuados para cada ensayo específico pueden ser fácilmente reconocidos por el experto en la materia y estos compuestos colorantes pueden ser introducidos en un dispositivo de tira seca reactiva para prueba de acuerdo con la presente invención.

65 En una realización de la presente invención, el compuesto colorante es seleccionado del grupo consistente en una sal de tetrazolio; 4-aminoantipirina/ sal de sodio de 3,5-dimetóxido-N-etilo-N-(2-hidróxido-3-sulfopropilo)-anilina; 4-aminoantipirina/ sal de sodio de 1-naftol-3,6-ácido disulfónico-2; 4-aminoantipirina/ sal de sodio de N-etilo-N-(2-hidróxido-3-sulfopropilo)-m-toluidina; 4-aminoantipirina/1,7-dihidroxinaftaleno; 4-aminoantipirina/sulfonato 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno; violeta de tetrazolio; ácido 3,5-dinitrobenzoico; sulfato de cobre; ácido N-1-naftilo-N'-

dietilenediamino-oxálico; Sal rápida del rojo TR; verde de bromocresol; azul de bromofenol; arsenazo III; 2-(3,5-dimetóxido-4-hidroxifenol)-4,5-bis(4-dimetilaminofenilo)-imidazola; tinte de piridilazo; tinte acoplador magenta; formazán 1,5-bis(2-hidróxido-3,5-diclorofenilo)-3-ciano; tartrato de cobre; hidrazona 3-metilo-2-benzotiazolinona; sulfonato de etano N-propilo-4-(2,6-dinitro-4-clorobencilo)quinolinio; imidazola de hidroxidiarilo; tetracolorozincato de diazonio de 2-metóxido-4-morfolinofenilo; 3,3', 5,5'-tetrametilo-benzidina; 4-aminofenazona/ sulfonato de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno; difosfato primaquino/hidrazona de 3-metilo-2-benzotiazolina; 2,5-ácido dinitrobenzoico; 2-(p-indofenilo)-3-(p-nitrofenilo)-5-cloruro de feniltetrazolio; 3-hidróxido-1,2,3,4-tetrahidrobenzo-(h)-quinolina; o cualquier derivado de los mismos.

10 Grado creciente de reacción

Como se mencionó *supra*, el tampón regulador proporciona un segundo entorno para dicho(s) reactivo(s), estando en un estado húmedo, permitiendo un grado incrementado de reacción entre el analito y el reactivo.

15 En una realización de la presente invención, el grado incrementado de reacción viene dado por un cambio en el pH por la adición de un ácido, una base o una combinación de los mismos.

El compuesto ancilar

20 Debido a la complejidad de las muestras líquidas que van a ser ensayadas en la presente invención, puede ser ocasionalmente una ventaja el usar un compuesto ancilar con objeto de mejorar el flujo y absorción de la muestra líquida en el tampón regulador y/o en el uno o más tampón(es) reactivo(s) y para proporciona una liberación rápida, consistente y igualitaria del/ de los reactivo(s) y los agentes capaces de incrementar el grado de reacción. El compuesto ancilar puede ser suministrado al dispositivo, o bien por a) su adición al/ a los tampón(es) reactivo(s) y/o  
25 tampón regulador solo o conjuntamente con la muestra líquida, b) incorporación del compuesto ancilar a al menos uno del/ de los tampón(es) reactivo(s) y/o el tampón regulador, o c) una combinación de los mismos.

En una realización de la presente invención, el compuesto ancilar y la muestra líquida se añaden al dispositivo de tira reactiva seca en capas. En el presente contexto, el término "capas" hace referencia a la división del volumen del  
30 compuesto ancilar y el volumen de la muestra líquida, y entonces el compuesto ancilar y la muestra líquida se añaden al primer entorno uno tras otro. En este caso, el compuesto ancilar puede añadirse como un líquido además de como un compuesto sólido. En una realización de la presente invención, el compuesto ancilar y la muestra líquida es dividido en al menos dos volúmenes, proporcionando cada uno 4 capas alternativas de compuesto ancilar y muestra líquida, por ejemplo, el compuesto ancilar y la muestra líquida son divididos en al menos 3 volúmenes,  
35 proporcionando cada uno 6 capas alternativas de compuesto ancilar y muestra líquida, tal como el compuesto ancilar y la muestra líquida son divididos en al menos 4 volúmenes, proporcionando cada uno 8 capas alternativas de compuesto ancilar y muestra líquida, por ejemplo el compuesto ancilar y la muestra líquida son divididos en al menos 6 volúmenes, proporcionando cada uno 12 capas alternativas de compuesto ancilar y muestra líquida, tal como el compuesto ancilar y la muestra líquida son divididos en al menos 8 volúmenes, proporcionando cada uno 16  
40 capas alternativas de compuesto ancilar y muestra líquida, por ejemplo, el compuesto ancilar y la muestra líquida son divididos en al menos 10 volúmenes, proporcionando cada uno 20 capas alternativas de compuesto ancilar y muestra líquida, tal como el compuesto ancilar y la muestra líquida son divididos en al menos 20 volúmenes, proporcionando cada uno 40 capas alternativas de compuesto ancilar y muestra líquida.

45 En otra realización ulterior de la presente invención, el compuesto ancilar puede estar impregnado en al menos un tampón(es) reactivo(s) y/o en el tampón regulador.

En otra realización de la presente invención, al menos un tampón reactivo y/o el tampón reactivo incorporan al menos un compuesto ancilar capaz de mejorar el flujo de la muestra líquida.

50 En otra realización ulterior de la presente invención el compuesto ancilar proporciona una liberación rápida, consistente y homogénea del/ de los reactivo(s) en el, al menos, un tampón reactivo y/o el agente capaz de incrementar el grado de reacción en el tampón regulador. Adicionalmente, el compuesto ancilar proporciona una baja afinidad para el enlace de proteínas.

55 Ulteriormente, el compuesto ancilar puede proporcionar una baja retención de muestras ricas en triglicéridos y/o puede disminuir la viscosidad de la muestra.

60 En una realización de la presente invención, el compuesto ancilar contiene constitutivos químicos seleccionados del grupo consistente de agua, un tensoactivo, una sal, un metal, un azúcar, una proteína y un lípido.

Preparación de la tira reactiva seca

65 El dispositivo de tira reactiva seca de acuerdo con la presente invención puede ser preparado por cualquier procedimiento convencional dispuesto para la preparación de dispositivos de tira seca reactiva. En una realización

preferida, el procedimiento para proporcionar un dispositivo de tira reactiva seca de acuerdo con la presente invención comprende las fases de:

- 5 (i) proporcionar un tampón reactivo por la impregnación de un primer material poroso con una solución acuosa que comprende un reactivo o una combinación de reactivos capaces de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad mejorada de almacenado del / de los reactivo(s) y del dispositivo de tira reactiva seca
- 10 (ii) Secar, por tanto, el tampón reactivo,
- (iii) Proporcionar un tampón regulador por la impregnación de un segundo material poroso con una solución acuosa que comprenda un segundo entorno para dicho(s) reactivo(s) estando en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno un grado incrementado de reacción entre el analito y el reactivo,
- 15 (iv) Secar, por tanto, el segundo material poroso impregnado
- (v) Poner en contacto el tampón reactivo con el tampón regulador, opcionalmente sobre un soporte sólido, para obtener el dispositivo de tira reactiva seca y

En donde el dispositivo de tira reactiva seca se basa en una determinación basada en enzimas y en donde las condiciones del primer entorno vienen dadas por el ajuste del volumen de pH a un valor que se desvía del valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en donde las condiciones del segundo entorno vienen dadas por la regulación del valor de pH a un valor que se aproxima al valor de pH óptimo de la(s) enzima(s) y en donde los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH.

El, al menos, un tampón reactivo y el tampón regulador pueden ser puestos en contacto por una superposición sustancialmente completa de los tampones, por superposición parcial de los tampones o por colocación del tampón regulador de forma adyacente a, al menos, un tampón reactivo. En una realización de la presente invención, la disposición de los tampones puede ser seleccionada de tal forma que se evite la precipitación de un compuesto de muestra sobre la superficie superior del dispositivo. Los componentes de muestra que pueden precipitarse pueden ser seleccionados del grupo consistente en proteínas, hidratos de carbono, grasa, células, u otros componentes presente en la muestra.

En una realización preferida de la presente invención, el primer entorno puede ser creado de tal forma que se favorezca el almacenado del/ de los reactivo(s) capaz/capaces de reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable – como se describió *supra*. Ulteriormente, el segundo entorno puede ser creado de tal forma que favorezca la puesta en funcionamiento del/ de los reactivo(s) capaz/capaces de reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable – también como se describió *supra*. Alternativa o adicionalmente, el segundo entorno puede ser creado de tal forma que se favorezca el grado de reacción entre el analito y los reactivo(s) capaz/capaces de reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable – como se describió *supra*.

En una realización ulterior de la presente invención, el primer entorno puede ser creado de tal forma que se favorezca la composición de la muestra de la que se sospecha que contiene el analito. En el caso en el que el analito pueda ser encontrado en la leche, debería cuidarse de sí, o bien el tampón de regulación o el, al menos, un tampón reactivo que comprende un valor de pH de alrededor de 6 ó menos es colocado en la parte superior de otros tampones y es adosado al tampón de aplicación, las proteínas de la leche pueden coagularse y formar un precipitado en la superficie superior del dispositivo de tira seca reactiva. Este precipitado puede provocar una disminución en la intensidad de la señal detectable. Así, puede preferirse que dicho tampón sea colocado hacia debajo del tampón de aplicación con objeto de evitar la disminución de la intensidad de la señal detectable.

#### Realizaciones adicionales

50 En una realización de la presente invención, se coloca al menos un tampón reactivo en relación con el tampón regulador de tal forma que se evite la precipitación de un componente de muestra sobre la superficie superior del dispositivo. El/los componente(s) de muestra que puede(n) precipitar pueden ser seleccionados del grupo consistente de proteínas, hidratos de carbono, grasa, células, u otros componentes presente en la muestra.

55 En los casos en los que el analito pueda ser encontrado en la leche, y donde la actividad esté siendo controlada por un cambio en el pH, debería cuidarse de sí, o bien el tampón de regulación o el, al menos, un tampón reactivo comprende un valor de pH de alrededor de 5 ó menos. Si tal tampón, que comprende un valor de pH de alrededor de 5 ó menos es colocado en la parte superior de otros tampones, las proteínas de la leche pueden coagularse y formar un precipitado en la superficie superior del dispositivo de tira seca reactiva. Este precipitado puede provocar una disminución en la intensidad de la señal detectable. Así, puede preferirse que dicho tampón sea colocado hacia debajo del tampón de aplicación con objeto de evitar una disminución no deseada de la intensidad de la señal detectable.

65 En una realización alternativa de la presente invención, el término “superficie superior” hace referencia a la superficie de dispositivo de tira reactiva seca de la presente invención de donde puede ser obtenida la señal detectable, o bien

por instrumentos o dispositivos adecuados o por inspección visual. Esta superficie puede ser la misma que la superficie a la que se aplica la muestra o puede ser una superficie diferente.

Determinación de LDH

5 Como se mencionó *supra*, los inventores de la presente invención han desarrollado ahora una nueva configuración de un dispositivo de tira seca reactiva para la determinación de la concentración de un analito en una muestra, pudiendo ser dicho analito lactato deshidrogenasa (LDH) en líquidos corporales. El dispositivo de tira reactiva seca de acuerdo con la presente invención puede ser útil para la detección cualitativa y la determinación cuantitativa de LDH en una muestra en donde el medio de prueba comprende una composición reactiva incorporada a un material poroso.

15 La determinación cuantitativa de LDH puede ser importante para la determinación de la inflamación mamaria que afecta a la integridad de la estructura glandular mamaria y, al mismo tiempo, daña los epitelios secretores y las barreras entre la leche y la sangre. En consecuencia, muchos componentes de la leche son afectados por la mastitis. Se ha señalado a la N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa, también llamada N-acetil glucosaminidasa (NAGasa) como uno de los marcadores de la inflamación mamaria. Además, se ha mostrado que otras enzimas en la leche, como el LDH puede ser de similar valor y actúa como un indicador adecuado de las mastitis, tanto como la NAGasa.

20 Alternativamente, la determinación cuantitativa de LDH puede ser extremadamente importante en la detección de enfermedades coronarias, especialmente ataques cardíacos, ya que, con posterioridad a un ataque cardíaco, la concentración de LDH en, por ejemplo, la sangre, se eleva notoriamente sobre su concentración normal. La detección temprana de tal elevación anormal en la concentración de LDH puede, por tanto, llevar, de forma obvia, a un diagnóstico más exacto y rápido de las enfermedades coronarias.

25 Debido a que el diagnóstico temprano de las irregularidades cardíacas es tan importante, una prueba para la detección de variables en la concentración de LDH en la sangre debe ser lo suficientemente rápida y sencilla para que el sanitario la lleve a cabo, pero lo suficientemente exacta como para permitir la realización del diagnóstico sin posibilidades serias de error o de lecturas falsas. Tal mecanismo viene representado por el dispositivo de tira reactiva seca de la presente invención. Al utilizar este novedoso dispositivo de tira reactiva seca, no es necesaria ninguna instrumentación ni ninguna mezcla ni reconstitución de reactivos. La prueba puede ser llevada a cabo, por tanto, en el propio hogar del paciente o en una consulta médica sin ninguna equipación especial.

35 En una realización de la presente invención, un procedimiento para el ensayo de LDH en una muestra puede comprender las etapas de:

- (i) Aplicar la muestra de la que se sospeche que contiene LDH al tampón reactivo
- 40 (ii) Permitir que la muestra se desplace al tampón reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos aptos para reaccionar con LDH, un derivado de LDH o un compuesto indicador para que LDH proporcione una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad mejorada de almacenado del/ de los reactivo(s) y dispositivo de tira reactiva seca estando en un estado no húmedo
- 45 (iii) Permitir a la muestra desplazarse desde el tampón reactivo a un tampón regulador, estando dicho tampón regulador en contacto con el tampón reactivo, creando el tampón regulador un segundo entorno para dicho reactivo estando en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre LDH y el reactivo, y
- 50 (iv) Permitir al reactivo y LDH, el derivado de LDH o el compuesto indicador para LDH que proporcionen una señal detectable.

55 En una realización ulterior de la presente invención, la determinación de LDH se basa en una determinación basada en enzimas.

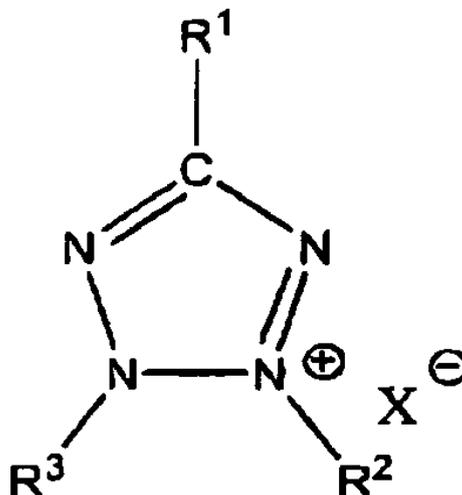
En otra realización ulterior de la presente invención, el grado incrementado de reacción viene dado por un cambio en el pH. Tal cambio en el pH ha sido descrito *supra*.

60 El nuevo dispositivo de tira reactiva seca para la determinación de la concentración de LDH en una muestra puede comprender, al menos, un tampón reactivo que comprende un material poroso tal como papel celulósico que contenga en el mismo el residuo seco resultante de la impregnación del mismo con un reactivo, una combinación de reactivos o una serie de materiales reactivos.

65 El primer reactivo puede ser una sal de tetrazolio. Este reactivo es capaz hacer que la zona del dispositivo de tira reactiva seca que entre en contacto con una muestra adquiriera un color de una intensidad tan variante como para ser

representativa de la concentración de LDH en el suero que se añade al indicador. Estos tintes son bien conocidos en el estado de la técnica y, generalmente, tienen la fórmula:

5



10 En el que R1, R2 y R3, de forma individual, son el mismo o diferente arilo o radicales de arilo sustituido y X es un anión tal como un halogenuro, etc.

15 Ejemplos de sales útiles de esta configuración incluyen 2,3,5-Trifenil-2H-cloruro de tetrazolio; 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil-2H-cloruro de tetrazolio (INT); nitroazul de tetrazolio; azul de tetrazolio; y similares. Estas sales pueden ser incorporadas al dispositivo de tira reactiva seca en concentraciones que van de alrededor de 0.05 partes a alrededor de 0.35 partes, preferiblemente, de alrededor de 0.1 partes a alrededor de 0.2 partes, basado en 100 partes de solución usadas, en una forma establecida *infra*.

20 Un segundo reactivo que puede ser incorporado al, al menos, un tampón reactivo del nuevo dispositivo de tira reactiva seca comprende un preventor de efecto cromatográfico que se usa con objeto de prevenir el movimiento cromatográfico de la sal de tetrazolio sobre la superficie del material poroso. Ejemplos de materiales que pueden ser usados para este fin incluyen el ácido polimetacrílico, ácido poliacrílico, celulosa de carboximetilo, copolímeros de ácido maleico y éter de metilvinilo y similares. Estos materiales se usan en cantidades que van de 0.1 partes a alrededor de 3.0 partes, preferiblemente de alrededor de 0.5 partes a alrededor de 2.5 partes, basado en 100 partes de solución usada.

30 Un tercer componente para su impregnación en el, al menos, un tampón reactivo, puede ser un antioxidante que se utiliza con objeto de prevenir la coloración prematura de la sal de tetrazolio. Ejemplos de antioxidantes adecuados incluyen los fenoles alquilados tales como butil-p-cresol 2,6-diterciario; hidroxitolueno butilado, catecol 4-t-butilo, octadecilo-3, 5-di-t-butil-4-hidróxido hidrocinnamato; bisfenoles alquilideno tales como 2,2'-metilenebis (6-t-butil-4-metil fenol), 4,4'-butilidenebis (6-t-butil-3-metil fenol); tiobisfenoles tales como 4,4'-tiobis (6-t-butil-3-metilfenol), 2,2'-tiobis (6-t-butil-4-metil fenol); polifenoles tales como tetrakis [metileno (3,5-di-t-butil-4-hidroxihidrocinnamato)] metano, 1,3,5-trimetil-2,4,6-tris (3,5-di-t-butil-4-hidroxibenzil) benceno; esteros como tiodipropionato ditricerilo, disteariltiodipropionato, diauriltiodipropionato; aminas como diaminas p-fenileno sustituidas por diarilo o dialquilo, difenilamina, N-fenil-, alfa, -naftilamina; fosfitos orgánicos como fosfito dibutilo, fosfito didecilo, fosfito dioctilo, fosfito difenildecilo, fosfito ditetradecilo, fosfito fenilidodecilo, fosfito fenilneopentilo, fosfito tridecilo, titriofosfito trilaurilo, fosfito trifenilo, fosfito trisonilo y diversos otros antioxidantes conocidos como las quinonas, incluyendo hidroquinona, éter de monometilo de hidroquinona, mono-t-butilhidroquinona, 2,5-di-t-butilo hidroquinona, toluhidroquinona, 2,5-di-t-amil hidroquinona y similares. Se puede usar también fenotiazina, hidroxibenzofenona, p-dimetilaminonitrosobenceno, ácido tiodipropiónico, etc.

40 Estos materiales antioxidantes pueden ser usados en cantidades que van de alrededor de 0.01 partes a 2.0 partes, preferiblemente de alrededor de 0.02 partes a 1.0 parte basados en 100 partes de solución, y pueden ser usados en combinación con la sal de tetrazolio o antes o después de su deposición.

45 Un cuarto componente que puede ser impregnado en el, al menos, un tampón reactivo, puede ser diaforasa, que se usa para catalizar la reducción de la sal de tetrazolio con NADH. Esta enzima es bien conocida en el estado de la

técnica y debería ser usada en concentraciones que vayan de alrededor de 0.02 partes a 0.2 partes por peso y es usada preferiblemente de 0.03 partes a 0.10 partes sobre 100 partes de solución usada.

5 Nicotinamida-adenina-dinucléotida, llamada en adelante NAD, mezclada con una sal de lactato de álcali tal como el lactato de litio, lactato de sodio, lactato de potasio y similares, comprende un constitutivo adicional que puede ser impregnado en el, al menos, un tampón reactivo. El uso de NAD es bien conocido en el estado de la técnica y debería ser empleado en concentraciones que vayan de alrededor de 0.01 partes a alrededor de 0.20 partes y es usado, preferiblemente de 0.015 partes a 0.08 partes por peso sobre 100 partes de solución. La sal de lactato se usa en cantidades que van de 0.03 partes a alrededor de 1.5 partes y se usa preferiblemente de 0.02 partes a 0.09 partes sobre 100 partes de solución usada.

Se cree que puede usarse la siguiente reacción de los reactivos presentes en la determinación de LDH en una muestra usando el mecanismo descrito *supra*:

15 L-lactato + NAD<sup>+</sup>      LDH      >      Piruvato + NADH + H<sup>+</sup>

NADH + NTB      Diaforasa      >      NAD<sup>+</sup> + tinte de Formazán

20 El LDH en el mismo puede causar una reacción que resulta en la reducción de la sal de tetrazolio y la formación de un indicador de color, la intensidad del cual es directamente proporcional a la concentración del LDH. El clínico, entonces, se limita a comparar el color que resulta con una carta normalizada de colores para averiguar la concentración de LDH del suero que está siendo probado.

25 Con objeto de conseguir resultados óptimos utilizando el nuevo dispositivo de tira reactiva seca de la presente invención, es también ventajoso, aunque no necesario, incorporar al, al menos, un tampón reactivo, un agente humidificador no – iónico adecuado, cualquiera de los conocidos como aplicables por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden ser usadas alcanolaminas grasas, esto es, la reacción alcanolamina se produce con ácidos grasos tales como el ácido laúrico o ácido graso de coco refinado, siendo las alcanolaminas adecuadas dietanolamina, monoetanolamina, amonisopropanolamina y similares; materiales derivados de óxido de etileno, esto es, los derivados de la reacción de óxido de etileno con alquilfenoles en los que el grupo alquilo es octilo, nonilo o superior, alcoholes grasos de cadena larga como alcohol tridecilo, lanolina, alcohol de lecitina, etc., ácidos grasos de cadena larga tales como aceite de pino, ácido oleico, ácido abiético, etc., mercaptanos grasos de cadena larga, aminas grasas de cadena larga, glicol de polioxipropileno, ester de sorbitán graso, ésteres de azúcar, esto es, los productos de reacción de alcoholisis del ester metilo de un ácido graso y sucrosa o rafinosa; polisorbitol; alcohol de polivinilo; celulosa de metilo; fenol etoxilado/resinas de formaldehído y similares. Se utilizan concentraciones de entre alrededor de 0.01 partes a alrededor de 1.0 partes de agente húmedo sobre 100 partes de solución, siendo añadidos los agentes humidificadores preferiblemente con cada componente, para el caso en que los componentes sean añadidos individualmente o en mezcla con los componentes si son añadidos como un sistema mezclado completo.

40 Al producir el nuevo dispositivo de tira reactiva seca, el sistema utilizado depende primariamente sobre el reactivo que está siendo utilizado como antioxidante para la sal de tetrazolio. Si el antioxidante es un solvente orgánico sólo soluble, el material poroso seco, generalmente papel, puede estar impregnado con los reactivos en una serie de baños. De forma alternativa, los reactivos son impregnados en dos o más tampones reactivos diferentes.

45 En una realización de la presente invención, puede ser preparada una solución acuosa de la sal de tetrazolio y, opcionalmente, en combinación con el preventor de efecto cromatográfico y el, al menos, un tampón reactivo puede ser puesto en contacto y, entonces, es secado tal como en un túnel de secado o en un horno de ventilación interna descendente. El tampón reactivo impregnado o segundo tampón reactivo puede ser entonces puesto en contacto con una solución solvente orgánica del antioxidante. El portador es secado de nuevo. Pueden ser entonces preparados una solución amortiguadora de diaforasa y, opcionalmente, un estabilizador de carbohidrato y uno de los una vez impregnados, los dos veces impregnados o tercer tampón reactivo puede ser impregnados con la misma y secados. Una solución amortiguadora de NAD y lactato de álcali puede ser preparada y uno de los papeles tratados, u otro tampón reactivo, esto es, cuarto tampón reactivo puede, por impregnación y un cuarto secado, completar la preparación del indicador de prueba.

50 En una realización de la presente invención, el procedimiento para la determinación de LDH en una muestra puede ser llevado a cabo usando un dispositivo de tira reactiva seca que tenga al menos un tampón reactivo que comprenda:

- 60
- (a) Un componente colorante,
  - (b) Diaforasa, y
  - (c) Una nicotinamida-dinucleótida, y
  - (d) Una sal de lactato.

65

Los reactivos ( a ), ( b ), ( c ) y ( d ) pueden estar en un único tampón reactivo o en tampones reactivos individuales, tal como en dos tampones reactivos diferentes, por ejemplo, en 3 tampones reactivos diferentes o como en cuatro tampones reactivos diferentes.

5 En otra realización de la presente invención, el dispositivo de tira reactiva seca comprende al menos un tampón reactivo que tiene:

( e ) un preventor de efecto cromatográfico, y/o

( f ) un antioxidante

10 Los reactivos ( e ) y ( f ) pueden estar en un único tampón reactivo con los reactivos ( a ), ( b ), ( c ) y ( d ) o en tampones reactivos individuales, tal como en 2 diferentes tampones reactivos.

15 Los reactivos pueden estar separados en al menos 2 tampones reactivos, tales como al menos 3 tampones reactivos, por ejemplo, al menos 4 tampones reactivos, tal como al menos 5 tampones reactivos, por ejemplo, al menos 6 tampones reactivos.

20 En una realización de la presente invención, el compuesto colorante se selecciona del grupo consistente de sal de tetrazolio o cualquier derivado de la misma.

Si se van a incorporar agentes humidificadores, etc., se añaden durante cualquiera o todas las impregnaciones para conseguir depósitos reactivos uniformes. Los materiales adecuados como hidrato de carbono estabilizador incluyen maltosa y sorbitol además de óxidos de etileno polimérico soluble en el agua tanto de alto como de bajo peso molecular, glicol de dietileno y similares en concentraciones que van de alrededor de 10.0 partes a alrededor de 25.0 partes, preferiblemente alrededor de 15.0 partes a alrededor de 20.0 partes sobre 100 partes de solución usada.

25 En una realización de la presente invención, puede ser usado un antioxidante soluble en el agua, y, entonces, todos los reactivos pueden ser mezclados conjuntamente en la solución amortiguadora, siendo las concentraciones de cada ingrediente como se señaló *supra* excepto en que cada una se basa en las mismas 100 partes de agua, y puede usarse un ciclo de "un baño-un secado" para obtener el deseado indicador de prueba.

30 Los ejemplos de amortiguadores útiles en cada procedimiento incluyen, amortiguador de fosfato, amortiguador de fetalato, amortiguador de tris, amortiguador de citrato – fosfato, amortiguador de borato – succinato, etc. El amortiguador preferido es el amortiguador de tris, esto es, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol en concentraciones de 0.05 a 0.2 M.

35 El cambio de color de los indicadores de prueba preparados de acuerdo con el proceso de multi – baño puede ser de rosa a rojo mientras que el cambio de color del procedimiento de un solo baño puede ir de amarillo a marrón.

40 Las concentraciones *supra* expresadas en relación con los componentes que pueden ser incorporados al nuevo dispositivo de tira reactiva seca se establecen únicamente como las soluciones de estos componentes que se saturan en el al menos un tampón reactivo y no están destinadas a especificar la cantidad de cada componente que esté eventualmente presente en el al menos un tampón reactivo. Es decir, la saturación del portador absorbente con una concentración específica de un componente específico en la solución no incorporará, de forma inequívoca, al material poroso la misma cantidad o porcentaje de componente presente en la solución. Se ha descubierto, sin embargo, que las concentraciones *supra* de solución pueden, de forma general, ser suficientes como para incorporar suficiente componente en el, al menos, un tampón reactivo al producirse la saturación con lo que se produce un dispositivo de tira reactiva seca funcional, siendo las capacidades absorbentes del, al menos, un tampón reactivo, características de los materiales generalmente usados con estos fines.

50 Aunque la discusión *supra* con respecto a la preparación de este dispositivo de tira reactiva seca muestra la saturación del, al menos, un tampón reactivo por baño, es algunas veces necesario, especialmente cuando se van a llevar a cabo una serie de saturaciones, aplicar la solución componente al, al menos, un tampón reactivo con preferencia a bañar el portador debido a que los baños extendidos pueden tender eliminar los componentes previamente depositados.

55 Es obvio para el experto en la materia que el primer y segundo entorno pueden ser cambiados si se lleva a cabo un diferente ensayo para la determinación de LDH. Además, es también obvio para el experto en la materia como optimizar el primero y segundo entorno basado en el conocimiento otorgado por el concepto de la presente invención, esto es, teniendo un primer entorno que puede ser seleccionado de tal forma que se favorezca el almacenado del/ de los reactivo(s) capaz/capaces de reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable y tener un segundo entorno que puede ser creado de tal forma que se favorezca la actuación del/ de los reactivo(s) capaz / capaces de reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable o para favorecer el grado de reacción entre el analito y el/los reactivo(s) capaz / capaces de reaccionar con el analito proporcionando una señal detectable.

60

65

En una realización preferida de la presente invención, el dispositivo de tira reactiva seca es desarrollado para medir LDH de acuerdo con el esquema de reacción mencionado *supra* para detectar LDH. En esta configuración, puede preferirse que el, al menos, un tampón reactivo esté dotado de un valor de pH de aproximadamente pH 6.8 y el tampón regulador está dotado un agente regulador de pH capaz de proporcionar un segundo entorno para el reactivo o la combinación de reactivos de aproximadamente pH 8.3.

#### Determinación de β-hidroxibutirato (BHB)

El BHB se forma cuando se moviliza grasa para energía. EL nivel de BHB, con otros cuerpos cetónicos, se incrementa durante el hambre o con infranutrición, de, por ejemplo, animales. El nivel está íntimamente relacionado con el estado energético cuando hay una alta demanda de glucosa, esto es, durante las últimas fases del embarazo y la lactancia de animales gregarios, como las vacas.

En una realización de la presente invención, la determinación de BHB puede ser llevada a cabo usando el mismo esquema de reacción como el dispuesto para la determinación de LDH según se dispuso *supra*.

En una realización preferida de la presente invención, el dispositivo de tira seca reactiva es desarrollado para medir BHB para detectar BHB de acuerdo con el esquema de reacción mencionado *supra*. En esta configuración, puede preferirse que el, al menos, un tampón reactivo esté dotado de un valor de pH de aproximadamente pH 6.8 y el tampón regulador esté dotado de un agente regulador de pH capaz de proporcionar un segundo entorno para el reactivo o la combinación de reactivos de aproximadamente pH 8.3.

#### Determinación de urea

La determinación de la utilización de proteína puede ser un parámetro importante. En la crianza de ganado, es altamente importante que los animales (por ejemplo, vacas) utilicen de forma óptima la proteína contenida en el alimento, porque la proteína es uno de los componentes alimenticios más caros. La utilización depende, entre otros factores, de la cantidad de energía y proteína simultáneamente presentes en el animal.

En una primera realización de la presente invención, la determinación de urea puede ser implementada usando el siguiente esquema de reacción:

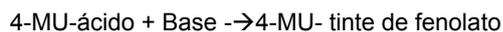


En una realización preferente de la presente invención, el dispositivo de tira reactiva seca es desarrollado para medir BHB de acuerdo con el esquema de reacción para detectar BHB mencionado *supra*. Con esta configuración, y al usar ureasa obtenida de canavalias, puede preferirse que el, al menos, un tampón reactivo esté dotado con un valor de pH de aproximadamente pH 8.0 y el tampón regulador esté dotado con un agente regulador de pH capaz de proporcionar un segundo entorno para el reactivo o la combinación de reactivos de un pH de aproximadamente 6.0.

#### Determinación de N-acetil glucosaminidasa (NAGasa)

La determinación cuantitativa de NAGasa puede, de la misma forma que el LDH, ser importante para la determinación de inflamación mamaria que afecta a la integridad de la estructura glandular mamaria y, además, daña el epitelio secretor y las barreras sangre – leche.

En una realización de la presente invención, la determinación de urea puede ser implementada usando el siguiente esquema de reacción:



Aquí, 4-MU-NAG se refiere a 4-metilumbelliferilo N-acetil-beta-D-glucosaminido, 4-MU-ácido se refiere a 4-metilumbelliferona y 4-MU-tinte de fenolato se refiere a una 4-sal de metilumbelliferona.

En una realización preferida de la presente invención, el dispositivo de tira seca reactiva se desarrolla para medir NAGasa de acuerdo con el esquema de reacción mencionado *supra* para detectar NAGasa. En esta configuración, puede preferirse que el, al menos, un tampón reactivo esté dotado de un valor de pH de aproximadamente pH 7.0 y el tampón de regulación está dotado de un agente regulador de pH capaz de proporcionar un segundo entorno para el reactivo o la combinación de reactivos de aproximadamente pH 4.6.

Es obvio para el experto en la materia que el primer y el segundo entorno pueden ser modificados si se pone a disposición un segundo ensayo para la determinación de LDH, BHB, urea, NAGasa o cualquier otro analito. Además,

es también obvio para el experto en la materia cómo optimizar el primer y segundo entorno basado en el conocimiento otorgado por el concepto de la presente invención, en concreto, teniendo un primer entorno que puede ser creado de tal forma que se favorezca el almacenaje del/ de los reactivo(s) capaz/ capaces de reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable y tener un segundo entorno que puede ser creado de tal forma que se favorezca la actuación del/ de los reactivo (s) capaz / capaces de reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable o favorecer el grado de reacción entre el analito y el/los reactivo(s) capaz/ capaces de reaccionar con el analito proporcionando un señal detectable.

El concepto de la presente invención será ulteriormente ilustrado en los siguientes ejemplos no limitativos:

## EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación y prueba de tiras reactivas secas de LDH.

Tipo 1 a, configuración de capa única, pH 6.8

### Preparación de solución de impregnación:

Se disuelven 1.5 g de L-lactato de litio, 3.0 g de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, 150 mg de glicol de polietileno 20.000, y 1.5 g de sucrosa en 120 mL de 0.1 M de amortiguador de fosfato pH 8.0. Entonces se añaden 1.5 mL de 5 % de solución de Tritón X-100, seguido por 1.5 g de albumina de suero bovino (ASB), 30 KU de diaforasa, y 150 mg de tetrazolio nitroazul (TNA). Se añade 0.1 M de amortiguador de fosfato de pH 8.0 para producir 150 mL en total y la solución es removida. El pH final de esta solución es pH 6.8.

### Impregnación de papel:

La solución de impregnación se transfiere a una cuba de acero inoxidable. Se impregna una hoja de papel de filtro de 20 x 20 cm. (por ejemplo, Whatman 3MMChr) en la solución de impregnación de pH 6.8 durante alrededor de 10 segundos. Entonces, el filtro de papel es retirado de la solución de impregnación y se deja escurrir manteniendo el papel en posición vertical durante alrededor de 30 segundos por el uso de una sujeción limpia. Pueden ser impregnados en total 10 ó 11 hojas.

### Secado:

Las hojas de papel de filtro impregnado son secadas en un horno bien ventilado a 38-42° C hasta que estén secas (aproximadamente, 45 minutos). Los papeles de filtro secos pueden ser mantenidos en bolsas de papel aluminio sellado con un agente de secado a alrededor de 4-6° C hasta su uso.

### Cortado:

La hoja impregnada es cortada en tiras de una anchura de 5 mm., por ejemplo en una cortadora giratoria, y, entonces, las tiras son cortadas en cuadrados de 5 mm x 5 mm cortando dichas tiras ortogonalmente, por ejemplo, en una cortadora giratoria.

Tipo 1 b, configuración de capa única, pH 8.3

### Preparación de solución de impregnación:

Se disuelven 1.5 g de L-lactato de litio, 3.0 g de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, 150 mg de glicol de polietileno 20.000, y 1.5 g de sucrosa en 120 mL de 0.1 M de amortiguador Tris-HCl pH 9.0. Entonces se añaden 1.5 mL de 5 % de solución de Tritón X-100, seguido por 1.5 g de albumina de suero bovino (ASB), 30 KU de diaforasa, y 150 mg de tetrazolio nitroazul (TNA). Se añade 0.1 M de amortiguador Tris-HCl pH 9.0 para producir 150 mL en total y la solución es removida. El pH final de esta solución es pH 8.3.

### Impregnación de papel:

La solución de impregnación se transfiere a una cuba de acero inoxidable. Se impregna una hoja de papel de filtro de 20 x 20 cm. (por ejemplo, Whatman 3MMChr) en la solución de impregnación de pH 8.3 durante alrededor de 10 segundos. Entonces, el filtro de papel es retirado de la solución de impregnación y se deja escurrir manteniendo el papel en posición vertical durante alrededor de 30 segundos por el uso de una sujeción limpia. Pueden ser impregnadas en total 10 ó 11 hojas.

### Secado:

Las hojas de papel de filtro impregnado son secadas en un horno bien ventilado a 38-42° C hasta que estén secas (aproximadamente, 45 minutos). Los papeles de filtro secos pueden ser mantenidos en bolsas de papel aluminio sellado con un agente de secado a alrededor de 4-6° C hasta su uso.

Cortado:

5 La hoja impregnada es cortada en tiras de una anchura de 5 mm., por ejemplo en una cortadora giratoria, y, entonces, las tiras son cortadas en cuadrados de 5 mm x 5 mm cortando dichas tiras ortogonalmente, por ejemplo, en una cortadora giratoria.

Tipo 2, configuración de doble capa, pH 6.8 en tampón reactivo, pH-12 en tampón reactivo

Preparación de solución de impregnación para tampón reactivo (pH 6.8):

10 Se disuelven 1.5 g de L-lactato de litio, 3.0 g de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, 150 mg de glicol de polietileno 20.000, y 1.5 g de sucrosa en 120 mL de 0.1 M de amortiguador de fosfato pH 8.0. Entonces se añaden 1.5 mL de 5 % de solución de Tritón X-100, seguido por 1.5 g de albumina de suero bovino (ASB), 30 KU de diaforasa, y 150 mg de tetrazolio nitroazul (TNA). Se añade 0.1 M de amortiguador de fosfato de pH 8.0 para producir 150 mL en total y la solución es removida. El pH final de esta solución es pH 6.8.

Impregnación del tampón reactivo:

20 La solución de impregnación se transfiere a una cuba de acero inoxidable. Se impregna una hoja de papel de filtro de 20 x 20 cm. (por ejemplo, Whatman 3MMChr) en la solución de impregnación de pH 6.8 durante alrededor de 10 segundos. Entonces, el filtro de papel es retirado de la solución de impregnación y se deja escurrir manteniendo el papel en posición vertical durante alrededor de 30 segundos por el uso de una sujeción limpia. Pueden ser impregnadas en total 10 ó 11 hojas.

Secado:

25 Las hojas de papel de filtro impregnado son secadas en un horno bien ventilado a 38-42° C hasta que estén secas (aproximadamente, 45 minutos). Los papeles de filtro secos pueden ser mantenidos en bolsas de papel aluminio sellado con un agente de secado a alrededor de 4-6° C hasta su uso.

Preparación de solución de impregnación para tampón de regulación (pH 12):

30 Se disuelven 50 g de TRIS (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) en 200 mL de agua de – ionizada para conseguir una solución es pH-12.

Impregnación del tampón de regulación:

40 La solución de impregnación se transfiere a una cuba de acero inoxidable. Se impregna un paño de 10 x 20 cm. (por ejemplo, Asahi Berncot PS-2) en la solución de impregnación de pH - 12 durante alrededor de 30 segundos. Entonces, el tampón de regulación es retirado de la solución de impregnación y se coloca plano sobre una bandeja de engranaje de acero inoxidable. Pueden ser impregnadas en total 25 hojas de tampones de regulación.

Secado:

45 Las hojas de papel de filtro impregnado son secadas en un horno bien ventilado a 38-42° C hasta que estén secas (aproximadamente, 10 minutos). Los paños secos pueden ser mantenidos en bolsas de papel aluminio sellado con un agente de secado a alrededor de 4-6° C hasta su uso.

Laminación de tampón reactivo impregnado pH 6.8 y tampón de regulación impregnado pH-12:

50 Se aplica una fina película de pegamento spray (por ejemplo, 3M #75) a un lado del tampón regulador impregnado. Se ubica una hoja cortada de 10 x 20 cm. de tampón reactivo impregnado sobre una superficie limpia plana y la hoja de tampón regulador pegado con spray se coloca encima del tampón reactivo, y las dos capas se laminan formando una sola por la aplicación de presión con un rodillo de cuero. Los bordes de la hoja laminada son recortados para eliminar el material no laminado. Las hojas laminadas pueden ser mantenidas en bolsas de papel aluminio sellado con un agente de secado a alrededor de 4-6° C hasta su uso.

Cortado:

60 La hoja impregnada es cortada en tiras de una anchura de 5 mm., por ejemplo en una cortadora giratoria, y, entonces, las tiras son cortadas en cuadrados de 5 mm x 5 mm cortando dichas tiras ortogonalmente, por ejemplo, en una cortadora giratoria. Los cuadrados son ordenados de tal forma que el lado del papel de filtro esté arriba.

Prueba de funcionamiento de tiras reactivas LDH 1a, 1b, y 2

La prueba de funcionamiento fue llevada a cabo de la forma siguiente: fue preparada una serie de calibración de LDH en leche fresca por adición de leche UHT con 0, 100, 500, y 1000 de enzima LDH (Sigma #L1378 de músculo bovino). Fueron añadidos 10 µL de leche de las series de calibración fueron añadidas a un tira reactiva a 25° C, que fue incubada entonces a 25° C durante 5 minutos. El desarrollo de color sobre la tira reactiva fue testado por el uso de un espectrofotómetro, en una longitud de onda de 520 nm.

Los resultados experimentales de la medición tiras reactivas tipos 1 a, 1 b y 2 se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Curvas de calibración con tipos de tira reactiva 1 a, 1 b, y 2

| LDH (U/L) | pH | Tipo 1 a | Tipo 1 b | Tipo 2   |
|-----------|----|----------|----------|--|
| 0         |    | 0.78     | 0.76     | 0.77   |
| 100       |    | 0.72     | 0.57     | 0.58   |
| 500       |    | 0.67     | 0.42     | 0.41   |
| 1000      |    | 0.60     | 0.34     | 0.33   |
|           |    |          |          | "6.8 comb. 12 --> 8.3" (Ver ejemplo 3 <i>infra</i> ) |

El tipo de tira reactiva 1 a, que fue impregnado a pH 6.8, da lugar a una curva de calibración relativamente poco profunda, en la que el intervalo dinámico abarca 0.18. El tipo de tira reactiva 1 b, que fue impregnado a pH 8.3, da lugar a una curva de calibración relativamente abrupta, en la que el intervalo dinámico abarca 0.42. El tipo de tira reactiva 2, que está constituido por un tampón reactivo impregnado a pH 6.8 combinado con un tampón de regulación impregnado a pH 12, da lugar a una curva de calibración relativamente abrupta bastante similar a la del tipo 1 b, en la que el intervalo dinámico abarca 0.44.

Examen de estabilidad acelerada de tiras reactivas LDH tipos 1 a, 1 b y 2

Un examen de estabilidad acelerada fue llevado a cabo por acumulación de tiras reactivas de los tres tipos (1 a, 1 b y 2), respectivamente, en bolsas de papel aluminio cerradas con agente de secado a 37° C durante 1 semana. Después de esto, fue llevado a cabo un examen de funcionamiento, según se describió *supra*. Generalmente, se acepta que si el funcionamiento no cambia después de una semana a 37° C en bolsas de papel aluminio cerradas, las tiras reactivas pueden tener un tiempo de almacenado de al menos 12 meses a 4° C en bolsas de papel aluminio cerradas. Por tanto, un examen de estabilidad acelerada da una buena indicación de la estabilidad real a largo plazo del material examinado.

Los resultados experimentales obtenidos con tiras reactivas tipos 1 a, 1 b y 2, respectivamente, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Estabilidad acelerada de tipos de tira reactiva 1 a, 1 b, y 2

| LDH (U/L) | pH | Tipo 1 a | Tipo 1 b | Tipo 2   |
|-----------|----|----------|----------|--|
| 0         |    | 0.77     | 0.63     | 0.77   |
| 100       |    | 0.72     | 0.54     | 0.57   |
| 500       |    | 0.68     | 0.42     | 0.41   |
| 1000      |    | 0.60     | 0.35     | 0.33   |
|           |    |          |          | "6.8 comb. 12 --> 8.3" (Ver ejemplo 3 <i>infra</i> ) |

La tira reactiva tipo 1 a, que fue impregnada a pH 6.8, da prácticamente la misma curva de funcionamiento después de 1 semana de envejecimiento acelerado, como antes. La tira reactiva tipo 1 b, que fue impregnada a pH 8.3 muestra una curva de calibración mucho menos profunda después de 1 semana de envejecimiento acelerado. El tipo de tira reactiva 2, que se configura por un tampón reactivo impregnado a pH 6.8 combinado con un tampón reactivo impregnado a pH 12, da prácticamente la misma curva de funcionamiento después de 1 semana de envejecimiento acelerado, como antes.

La tira reactiva tipo 2, así, muestra el mismo buen funcionamiento que la tira reactiva tipo 1 b y la misma buena estabilidad de almacenado que la tira reactiva tipo 1 a.

Ejemplo 2. Selección de pH óptimo con relación a efectividad y estabilidad, respectivamente.

- a. Configuración de tira reactiva de capa única para la medición de LDH; variación de pH de líquido de impregnación.

Examen 1 (amortiguador de fosfato, pH final de 6.81)

Se preparó líquido de impregnación de 100 mM de amortiguador de fosfato (pH 8.0), lactato (10 mg/mL), NAD<sup>+</sup> (20 mg/mL), diaforasa (200 U/mL) y NTB (2 mg/mL) para obtener un pH final de 6.81. Se impregnó papel Whatman 3MMChr y se secó en un horno a 40° C durante 1 hora. Se cortaron cuadrados de 5 x 5 mm del papel impregnado y se instalaron en alojamientos plásticos.

5

Examen 2 (amortiguador TRIS, pH final de 8.18)

10

Se preparó líquido de impregnación de 100 mM de amortiguador TRIS (pH 9.0), lactato (10 mg/mL), NAD<sup>+</sup> (20 mg/mL), diaforasa (200 U/mL) y NTB (2 mg/mL) para obtener un pH final de 8.18. Se impregnó papel Whatman 3MMChr y se secó en un horno a 40° C durante 1 hora. Se cortaron cuadrados de 5 x 5 mm del papel impregnado y se instalaron en alojamientos plásticos.

15

Serie normalizada de LDH: fueron preparados paneles de LDH de Sigma LDH (L-2525) en leche UHT con las siguientes actividades: 0 U/L, 100 U/L, 500 U/L, y 1000 U/L.

Las tiras reactivas fueron examinadas por la adición de 8 µL de LDH normalizado a 25° C. El tiempo de incubación: 5 minutos.

20

Resultados de efectividad de tira reactiva:

Los resultados de efectividad se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Investigación de efectividad de los exámenes 1 y 2.

| Examen      | Reflectancia % |         |         |          | $\Delta_{0-1000}$ |
|-------------|----------------|---------|---------|----------|-------------------|
|             | 0 U/L          | 100 U/L | 500 U/L | 1000 U/L |                   |
| #1, pH 6.81 | 80             | 76      | 67      | 60       | 20                |
| #2, pH 8.18 | 65             | 57      | 42      | 35       | 30                |

25

Los resultados muestran que diferencia de reflectancia sobre el intervalo 0-1000 U/L, es significativamente más elevada con tiras reactivas preparadas en un PH 8.18 en amortiguador TRIS que con tiras reactivas preparadas en un pH 6.81 en amortiguador de fosfato. Esto significa que la sensibilidad es más elevada con tiras reactivas preparadas en pH 8.18 en amortiguador TRIS que con tiras reactivas preparadas en pH 6.81 en amortiguador de fosfato.

30

Resultados de estabilidad de tira reactiva:

35

Las tiras reactivas fueron guardadas en bolsas de papel aluminio sellado con agente de secado a 4, 30 y 37° C, respectivamente, durante 1 semana. Las tiras reactivas fueron entonces examinadas como se describió supra, y los resultados se presentan en la Tabla 2.

40

Tabla 2: Examen de tiras reactivas de la investigación de estabilidad de las pruebas 1 y 2.

| Experimento | Temperatura de almacenaje °C | Reflectancia % |         |         |          |
|-------------|------------------------------|----------------|---------|---------|----------|
|             |                              | 0 U/L          | 100 U/L | 500 U/L | 1000 U/L |
| #1, pH 6.81 | 4                            | 78.8           | 77.3    | 69.5    | 63.1     |
|             | 30                           | 77.7           | 76.3    | 69.0    | 62.8     |
|             | 37                           | 77.1           | 73.8    | 67.4    | 59.9     |

|             |    |      |      |      |      |
|-------------|----|------|------|------|------|
| #2, pH 8.18 | 4  | 64.4 | 58.0 | 43.1 | 36.1 |
|             | 30 | 59.6 | 54.8 | 41.5 | 34.7 |
|             | 37 | 53.1 | 48.8 | 38.8 | 33.9 |

Las tiras reactivas preparadas en un pH 6.81 en amortiguador de fosfato muestran sólo un desplazamiento menor cuando van de 4 a 30 y más a 37° C. En contraste, las tiras secas preparadas en un pH 8.18 en amortiguador TRIS muestran un descenso significativo de los valores de reflectancia en el extremo inferior de actividad LDH del intervalo. Los resultados muestran que la estabilidad de las tiras reactivas preparadas en un pH 6.81 en amortiguador de fosfato es significativamente mejor que la de las tiras reactivas preparadas en un pH 8.18 en amortiguador TRIS.

b. Configuración de tira reactiva de capa única para la medición de LDH; variación de pH de muestra LDH.

Prueba 3 (ajuste de pH llevado a cabo por el uso de amortiguador TRIS):

Series normalizadas de LDH en leche:

0 U/L-series: Fue preparada una serie normalizada de leche UHT sin la adición de ningún LDH, pero con pH ajustado en valores discretos en el intervalo de 6.55 a 8.84, por la mezcla de leche UHT con leche UHT drogada con amortiguador TRIS (100 mM). Los valores discretos de pH son: 6.55, 7.20, 7.83, 8.13, 8.33, 8.44, 8.57, 8.64, 8.72, 8.77 y 8.84.

175 U/L-series: Fue preparada una serie normalizada de leche UHT con la adición de 175 U/L LDH, y con pH ajustado en valores discretos en el intervalo de 6.55 a 8.84, por la mezcla de leche UHT con leche UHT que contiene 175 mM LDH y drogada con amortiguador TRIS (100 mM). Los valores discretos de pH son como los señalados *supra*.

350 U/L-series: Fue preparada una serie normalizada de leche UHT con la adición de 350 U/L LDH, y con pH ajustado en valores discretos en el intervalo de 6.55 a 8.84, por la mezcla de leche UHT con leche UHT que contiene 350 mM LDH y drogada con amortiguador TRIS (100 mM). Los valores discretos de pH son como los señalados *supra*.

Las tiras reactivas fueron examinadas por la adición de 10 µL de LDH normalizado a 25° C. Tiempo de incubación: 5 minutos.

Resultados de efectividad de tira reactiva:

Los resultados de efectividad se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Prueba de tiras reactivas con LDH en muestras de leche ajustadas a diversos valores de pH por el uso de amortiguador TRIS

| Examen       | Reflectancia % |         |         | $\Delta_{0-350}$ |
|--------------|----------------|---------|---------|------------------|
|              | 0 U/L          | 175 U/L | 350 U/L |                  |
| 3 A, pH 6.55 | 73.7           | 58.0    | 49.4    | 24.3             |
| 3 B, pH 7.20 | 73.3           | 55.0    | 46.5    | 26.8             |
| 3 C, pH 7.83 | 74.0           | 50.1    | 44.6    | 29.4             |

|              |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|
| 3 D, Ph 8.13 | 71.7 | 46.8 | 38.8 | 32.9 |
| 3 E, pH 8.33 | 71.6 | 41.7 | 33.8 | 37.8 |
| 3 F, pH 8.44 | 71.1 | 35.4 | 29.8 | 41.3 |
| 3 G, pH 8.57 | 68.9 | 34.1 | 27.4 | 41.5 |
| 3 H, pH 8.64 | 68.2 | 32.5 | 27.1 | 41.1 |
| 3 I, pH 8.72 | 68.7 | 31.9 | 26.0 | 42.7 |
| 3 J, pH 8.77 | 66.0 | 31.7 | 24.6 | 41.4 |
| 3 K, pH 8.84 | 68.0 | 31.4 | 24.6 | 43.4 |

Los resultados muestran que la efectividad mejora cuando se incrementan los valores de pH en muestras de leche. La mejora de la efectividad tienen a nivelarse a un valor de pH de alrededor de 8.4

5 Conclusión:

10 Estas pruebas demuestran que la mejores condiciones de pH para una eficiencia óptima para la determinación de LDH bajo las presentes condiciones son el uso del amortiguador TRIS en un pH de alrededor de 8.18, condición en la cual el estabilidad de almacenaje pasaba a ser mala. Por otro lado, para mejorar la estabilidad de almacenaje, el valor de pH debería ser reducido y se ha mostrado que el pH de alrededor de 6.81 es significativamente mejor que la estabilidad de almacenaje dispuesta en un pH 8.18.

15 Así, el valor inicial de pH del tampón regulador puede ser determinado por exámenes de prueba y error que, cuando se combinan con el valor de pH (pH 6.81), proporcionando una estabilidad de almacenaje mejorada, proporcionará la efectividad óptima (o cercana a lo óptimo) de la tira reactiva.

20 Además, se ha demostrado también que la presente invención proporciona un sistema estable o dispositivo de tira reactiva seca donde las desviaciones menores del valor de pH óptimo del tampón regulador tienen un efecto limitado o nulo en la efectividad del dispositivo de tira reactiva seca, que aparente ser de prueba 3F a 3K.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de tira reactiva seca para la determinación de un analito en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo:
- (i) Opcionalmente, un soporte sólido,
- 10 (ii) Al menos, un tampón almohadilla de reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos apta para reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable cuando esté en un estado humedecido, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo, un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad de almacenado mejorada de lo(s) reactivo(s) y del dispositivo de tira reactiva cuando esté en un estado humedecido
- 15 (iii) Estando un tampón regulador en contacto con el, al menos, un tampón reactivo, creando el tampón reactivo un segundo entorno para dicho(s) reactivo(s) estando en un estado humedecido, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre el analito y el/los reactivo(s), y
- 20 En el que la muestra se aplica a una superficie del dispositivo de tira reactiva seca y la señal detectable es detectada sobre la misma y en el que la determinación del analito se basa en una determinación con base en enzimas y en el que las condiciones, en el primer entorno, se consiguen por el ajuste del valor de pH a una valor que se desvía del valor de pH óptimo de la(s) enzima(s) y en el que las condiciones del segundo entorno se consiguen por la regulación del valor de pH hasta alcanzar un valor que se acerca al valor
- 25 óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en el que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH.
- 30 2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que el analito se selecciona de entre el grupo consistente en una proteína, una enzima, tal como la catalasa, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, carboxilesterasa, arilesterasa,  $\beta$ -glucuronidasa, lactoperoxidasa, lipasa, lisozima, xantina oxidasa, plasmina y beta-N-acetilhexosaminidasa (NAGasa), prostaglandina D sintasa (PGDS), una grasa, un hidrato de carbono, un antibiótico, un esteroide, una vitamina, un compuesto químico tal como urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tales como acetoacetato, betahidroxibutirato (BOHB), acetona, ácido ascórbico, nitratos, urobilinógeno, colesterol, y esteroides tales como pregnolona, progesterona, testosterona, dihidrotestosterona, estrona, estradiol, cortisol, cortisona, aldosterona, corticosterona, androstenediona,  $17\alpha$ -OH- pregnenolona,  $17\alpha$ -OH- progesterona, 11-desoxi-corticosterona, 11-desoxicortisol y dehidroepiandrosterona, hormona luteinizante o gonadotropina coriónica humana, una célula, tal como un leucocito, una droga de abuso y sangre.
- 40 3. Un dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un tampón reactivo está ubicado en relación con el tampón regulador para evitar la precipitación de un componente de muestra en la superficie superior del dispositivo.
- 45 4. Un dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer entorno es creado de tal forma que se favorezca la estabilidad de almacenado del/ de los reactivo(s) aptos para reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable.
- 50 5. Un procedimiento para ensayar un analito en una muestra de leche, comprendiendo dicho procedimiento las fases de:
- (i) Aplicación de la muestra de leche de la que se sospecha que contiene el analito a un tampón reactivo
- 55 (ii) permitir que la muestra se desplace al interior del tampón reactivo que comprende un reactivo o una combinación de reactivos aptos para reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para que dicho analito proporcione una señal detectable estando en un estado humedecido, proporcionando el, al menos, un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad de almacenado mejorada del/ de los reactivo(s) y del dispositivo de tira reactiva seca cuando estén en un estado no húmedo
- 60 (iii) Permitir que la muestra, sola o conjuntamente con el reactivo, se desplace desde el tampón reactivo al interior de un tampón regulador, estando dicho tampón regulador en contacto con el tampón reactivo, creando el tampón reactivo un segundo entorno para dicho reactivo cuando está en un estado húmedo, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre el analito y el/los reactivo(s),
- (iv) Permitir que el reactivo y el analito, el derivado de dicho analito o el compuesto indicador de dicho analito proporcionen una señal detectable, y
- 65 (v) Detectar la señal detectable sobre la misma superficie a la que se aplicó la muestra y

En el que la determinación del analito se basa en una determinación con base en enzimas y en el que las condiciones, en el primer entorno, se consiguen por el ajuste del valor de pH a una valor que se desvía del valor de pH óptimo de la(s) enzima(s) y en el que las condiciones del segundo entorno se consiguen por la regulación del valor de pH hasta alcanzar un valor que se acerca al valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en el que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el analito se selecciona de entre el grupo consistente en una proteína, una enzima, tal como la catalasa, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, carboxilesterasa, arilesterasa,  $\beta$ -glucuronidasa, lactoperoxidasa, lipasa, lisozima, xantina oxidasa, plasmina y beta-N-acetilhexosaminidasa (NAGasa), prostaglandina D sintasa (PGDS), una grasa, un hidrato de carbono, un antibiótico, un esteroide, una vitamina, un compuesto químico tal como urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tales como acetoacetato, betahidroxibutirato (BOHB), acetona, ácido ascórbico, nitratos, urobilinógeno, colesterol, y esteroides tales como pregnolona, progesterona, testosterona, dihidrotestosterona, estrona, estradiol, cortisol, cortisona, aldosterona, corticosterona, androstenediona,  $17\alpha$ -OH- pregnenolona,  $17\alpha$ -OH- progesterona, 11-desoxi-corticosterona, 11-desoxicortisol y dehidroepiandrosterona, hormona luteinizante o gonadotropina coriónica humana, una célula, tal como un leucocito, una droga de abuso y sangre.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que el primer entorno es creado de tal forma que se favorezca la estabilidad de almacenado del/ de los reactivo(s) aptos para reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el segundo entorno es creado de tal forma que se favorezca el índice de reacción entre el analito y el/ de los reactivo(s) aptos para reaccionar con el analito y proporcionar una señal detectable.
9. Un procedimiento para la preparación del dispositivo de tira reactiva seca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo dicho procedimiento las fases de:
  - (i) Proporcionar un tampón reactivo por la impregnación de un primer material poroso con una solución acuosa que comprende un reactivo o una combinación de reactivos aptos para reaccionar con el analito, para que un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito proporcionen una señal detectable estando en un estado húmedo, proporcionando el al menos un tampón reactivo un primer entorno para dicho(s) reactivo(s), permitiendo dicho primer entorno una estabilidad de almacenado mejorada del/ de los reactivo(s) y del dispositivo de tira seca reactiva
  - (ii) Secar, consecuentemente, el tampón reactivo,
  - (iii) Proporcionar un tampón regulador por la impregnación de un segundo material poroso con una solución acuosa creando un segundo entorno para dicho(s) reactivo(s) estando en un estado de humedad, permitiendo dicho segundo entorno un índice incrementado de reacción entre el analito y el reactivo,
  - (iv) Secar, consecuentemente, el segundo material poroso impregnado, y
  - (v) Poner en contacto el tampón reactivo con el tampón regulador, opcionalmente sobre un soporte sólido, para obtener el dispositivo de tira reactiva seca y

En el que el dispositivo de tira reactiva seca se basa en una determinación con base en enzimas y en el que las condiciones, en el primer entorno, se consiguen por el ajuste del valor de pH a una valor que se desvía del valor de pH óptimo de la(s) enzima(s) y en el que las condiciones del segundo entorno se consiguen por la regulación del valor de pH hasta alcanzar un valor que se acerca al valor óptimo de pH de la(s) enzima(s) y en el que los diferentes entornos tienen diferentes valores de pH.

10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que al menos un tampón reactivo está ubicado en relación con el tampón regulador para evitar la precipitación de un componente de muestra en la superficie superior del dispositivo.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el componente de muestra se selecciona del grupo consistente en proteínas, hidratos de carbono, grasas, células, u otros componentes presentes en la muestra.
12. El uso de un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la determinación de un analito en una muestra.