

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 196**

51 Int. Cl.:
G01N 33/62 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07702519 .5**
96 Fecha de presentación: **19.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1982183**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **Dispositivo de bastoncillo seco y método para determinar un analito en una muestra**

30 Prioridad:
19.01.2006 DK 200600083
19.01.2006 US 759952 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

73 Titular/es:
LATTEC I/S (100.0%)
Slangerupgade 69
3400 Hillerod, DK

72 Inventor/es:
NYGAARD, LARS

74 Agente/Representante:
LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 389 196 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

Dispositivo de bastoncillo seco y método para determinar un analito en una muestra.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se relaciona con el campo del análisis de un analito en una muestra de leche. Particularmente, la presente invención se refiere a una construcción mejorada de un dispositivo de bastoncillo seco para la determinación de un analito en una muestra de leche mediante el uso de un ensayo químico, donde se tiene particular cuidado de evitar la precipitación de los componentes de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo que causan limitación de la señal detectable.

ARTE ANTERIOR

15 El mejoramiento del hato lechero (DHI, por sus siglas en inglés) se ha basado siempre en el registro de la leche de las vacas individuales en un hato. Al aumentar este conocimiento de cada vaca individual, es posible aumentar la cantidad y mejorar la calidad de la leche. Además, se mejora la situación de salud general y con ello los ingresos de los granjeros aumentarán. Una forma de que los granjeros aumenten sus ingresos puede ser optimizar la alimentación mediante el monitoreo del contenido de urea.

20 En la cría de las vacas lecheras, es muy importante que los animales (por ejemplo, las vacas) utilicen óptimamente el contenido de proteína de la alimentación, ya que la proteína es uno de los componentes más caros de la alimentación. La utilización depende, entre otros, de la cantidad de energía y proteína simultáneamente presente en el animal.

25 Cuando un alimento contiene más proteína de la necesaria, no todo el amoníaco formado de ahí puede procesarse en la panza. El exceso de amoníaco es absorbido por la sangre y descargado en el hígado donde el amoníaco se convierte en urea (CO(NH₂)₂). Esta urea es absorbida en la sangre y ampliamente excretada a través de la orina. De la sangre, una pequeña parte de la urea encuentra además su camino hacia la leche. En una vaca que produce 25 kg de leche, el contenido de urea es generalmente de aproximadamente 5 a 8 g urea por 25 kg de leche o (0,2 a 0,3 g/l). Mientras más amoníaco en la panza, más urea en la sangre, lo que significa más urea en la leche.

30 El exceso de proteína (que proporciona además exceso de nitrógeno, debido a que la proteína incluye nitrógeno) en la alimentación conduce a un contenido superior de urea en la leche. En consecuencia, desde el punto de vista de la utilización del nitrógeno, es deseable un contenido de urea inferior. Sin embargo, existe además un límite inferior. Un bajo contenido de urea indebido indica una relación de energía impropia en la alimentación o un bajo contenido de proteína indebido de la alimentación. Si los animales se alimentan menos producirán menos leche de lo que son capaces y/o el contenido de proteína en la leche disminuye.

35 Otro punto importante puede ser que se requiera energía para procesar la urea. En otras palabras, un alto balance de nitrógeno es además energéticamente desfavorable.

40 Existe una relación directa entre la cantidad de proteína alimentada y la concentración de urea en la sangre y la leche. Los altos resultados de MUN (nitrógeno uréico en la leche) indican una oportunidad para reducir el contenido de proteína de la dieta, sin reducir la producción de leche. Esto reducirá los costos de alimentación y además reduce la liberación de nitrógeno al medio ambiente. Una sobrealimentación con proteínas, que resulta en altos niveles de urea en la leche, tendrá las siguientes consecuencias:

- Se necesita energía para que las vacas sintetizen urea para la excreción
- Reducción de la cantidad de energía disponible para la producción de leche
- Menos energía disponible puede poner el inicio de la lactancia en riesgo aumentado de cetosis
- 50 • El alto nivel de urea es tóxico para la esperma y el embrión y puede resultar en una fertilidad reducida.
- Los altos niveles de urea contribuyen a la contaminación ambiental

55 Hoy, muchos granjeros sobrealimentan proteína en 10-20%. La sobrealimentación de proteína en 20 % conducirá a un incremento del costo de aproximadamente USD 50/vaca/año. La información dada por los granjeros al observar el nitrógeno uréico en la leche proporcionará las bases para las decisiones de cómo cambiar la alimentación, especialmente concerniente a la relación energía/proteína (ver la tabla más abajo). Debido a que los niveles de MUN se afectan por un gran número de factores relacionados con las vacas, que incluyen edad, etapa de lactación, estado de salud, consumo de agua e ingesta de materia seca, las vacas alimentadas con la misma ración frecuentemente tienen valores de MUN muy diferentes. Por lo tanto, se recomienda generalmente usar los resultados de MUN de un mínimo de 60 10 vacas para diagnosticar problemas de alimentación.

Toda la información de las muestras de leche proporcionadas en el contenido de urea, más muchos otros datos de las vacas individuales, pueden almacenarse en o sobre varias bases de datos. Un número de bases de datos pueden estar enlazadas y pueden ser usadas por los consultantes, veterinarios, asesores y otros sin necesidad de visitar las granjas. La información puede usarse para comparar la situación en diferentes países, mejorar los valores de reproducción, optimizar la alimentación y reducir el problema con la alimentación insuficiente.

Así, la determinación de la urea en una muestra se ha hecho cada vez más popular y se usan frecuentemente tecnologías que permitan la medición de un gran número de muestras y el nitrógeno uréico en la leche (MUN) como un indicador de niveles de amoniaco en la panza. El contenido de MUN es un reflejo exacto y rápido de la cantidad de nitrógeno absorbido por la vaca pero no se usa para el crecimiento o síntesis de proteína de la leche. La determinación del contenido de urea en una muestra empleando enzimas basada en los dispositivos de prueba como Reflotest y Azotest®Strip/Azostix son bien conocidos por una persona con experiencia en la industria. Tanto el Reflotest como Azotest®Strip/Azostix emplean la ureasa y colorantes azo para la determinación de urea en una muestra.

El contenido de urea en una muestra puede determinarse además usando un ensayo químico que utiliza agentes colorantes tales como o-ftalaldehído, tales ensayos químicos son bien conocidos por la persona con experiencia en la industria. Frecuentemente, los ensayos químicos involucran compuestos/compuestos de control (tales como ácidos) que pueden causar la precipitación de los componentes de la muestra.

El documento de patente US 4,215,995 describe medios de prueba para determinar el contenido de urea en una muestra. Los medios de prueba involucran un papel de filtro sencillo que se impregna en una aplicación de tres etapas de reactivos (que incluyen o-ftalaldehído) separada una de otra por una matriz portadora modificada ácida. De este modo, se alcanza una estabilidad superior de los reactivos y puede evitarse la precipitación de las proteínas del suero al proporcionar una matriz ácida adecuada usando un papel cargado con un intercambiador de cationes fuerte. El problema con el dispositivo proporcionado por US 4,215,995 es que el componente de acidez no se aísla de los reactivos y será contactado directamente con muestras de líquido sensibles al pH las cuales pueden causar la precipitación de los componentes de la muestra en la cara superior del dispositivo y reduce así la señal legible.

La solicitud de patente JP 10-229023 describe un dispositivo de ensayo que comprende un soporte sólido y una almohadilla reactiva y una almohadilla reveladora para la determinación de urea en una muestra, tal como sangre, suero o plasma. La almohadilla reactiva se impregna con o-ftalaldehído glicerina acetal, polivinil pirrolidona y agua destilada. La almohadilla reveladora se impregna con oxalato de N-1-naftil-N'-dietiletilendiamina, ácido 4-sulfoftálico en una solución acuosa, un surfactante y agua destilada. La almohadilla reactiva se recubre después sobre el soporte sólido, la almohadilla reveladora se recubre sobre esta almohadilla reactiva. El problema de usar este o un dispositivo de ensayo similar para la determinación de urea en una muestra tal como leche es que el ácido impregnado en la almohadilla reveladora (la capa superior) causa que las proteínas de la leche precipiten en la parte superior del dispositivo. Esta precipitación interfiere con el desarrollo del color cuando se determina la urea y puede aumentar los números de resultados falsos.

Así, existe una necesidad en la industria de una construcción de bastoncillos secos simples donde se limite o se evite la interferencia de los componentes de la muestra precipitados.

SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCÓN

En consecuencia, en un primer aspecto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de un analito en una muestra de leche por medio de un ensayo químico en donde dicho dispositivo de bastoncillo seco se construye de manera de limitar o evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche. El dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende:

- (i) opcionalmente un soporte sólido,
- (ii) al menos una almohadilla reactiva que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando está en estado húmedo,
- (iii) una almohadilla reveladora que se localiza en contacto con la al menos una almohadilla reactiva, opcionalmente entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable,

en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo y en donde la muestra se aplica en la cara

superior del dispositivo y se obtiene una señal detectable de la cara superior del dispositivo y en donde el compuesto de control es un compuesto ácido capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6 y en donde la cara superior del dispositivo se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva.

5

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de un analito en una muestra de leche por medio de un ensayo químico. El dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende:

10

(i) opcionalmente un soporte sólido,

15

(ii) al menos una almohadilla reactiva que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando está en estado húmedo,

20

(iii) una almohadilla reveladora que se localiza en contacto con la al menos una almohadilla reactiva, opcionalmente entre el soporte sólido y la almohadilla reactiva, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable,

25

en donde la al menos una almohadilla reactiva es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche de 6 o por encima de 6 para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra, y el compuesto de control presente en la almohadilla reveladora es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6, en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo, en donde la muestra se aplica en la cara superior del dispositivo y se obtiene la señal detectable de la cara superior del dispositivo que se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva.

30

Además, es un aspecto de la presente invención proporcionar un dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de urea en una muestra de leche, dicho dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende, opcionalmente un soporte sólido y al menos 2 almohadillas, dichas al menos 2 almohadillas comprenden (i) al menos una almohadilla reactiva que comprende o-ftalaldehído o un derivado de este, un compuesto colorante y un detergente, y (ii) una almohadilla reveladora que comprende al menos un ácido, en donde la almohadilla reveladora se localiza corriente abajo de la al menos una almohadilla reactiva.

35

Es además el objetivo de la presente invención proporcionar un método para la preparación del dispositivo de bastoncillo seco de acuerdo con la presente invención. El método comprende las etapas de:

40

(i) proporcionar al menos una almohadilla reactiva impregnando un primer material poroso con una solución acuosa que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando esté en estado húmedo,

45

(ii) después de eso secar la al menos una almohadilla reactiva,

(iii) proporcionar una almohadilla reveladora impregnando un segundo material poroso con una solución acuosa que comprende al menos un compuesto de control el cual, cuando está en estado húmedo, es capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable,

(iv) después de eso secar el segundo material poroso impregnado

50

(v) inmovilizar el primer material poroso con el segundo material poroso, opcionalmente en un soporte sólido, para obtener el dispositivo de bastoncillo seco.

55

En un objetivo adicional de la presente invención, se proporciona un método para la determinación de un analito en una muestra de leche. El método comprende las etapas de:

(a) aplicar la muestra sospechosa de contener el analito al dispositivo de prueba de bastoncillo seco, dicho dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende:

60

(i) al menos una almohadilla reactiva que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando esté en estado húmedo, y

(ii) en contacto con dicha al menos una almohadilla reactiva se localiza una almohadilla reveladora, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable, en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo.

(b) permitir que la muestra emigre en la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora y movilizar el al menos un reactivo y el al menos un compuesto de control, y

(c) permitir que el al menos un reactivo y el analito, el derivado de dicho analito o el compuesto indicador para dicho analito reaccionen y proporcionen una señal detectable.

La presente invención será descrita ahora con más detalle a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

Los inventores de la presente invención encontraron y desarrollaron sorprendentemente una nueva construcción de un dispositivo de prueba de bastoncillo seco en donde se limita o evita la interferencia de los componentes precipitados de la muestra de leche .

La nueva construcción del dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de un analito en una muestra de leche por medio de un ensayo químico comprende: (i) opcionalmente un soporte sólido, (ii) al menos una almohadilla reactiva 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 dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando está en estado húmedo, (iii) una almohadilla reveladora que se localiza en contacto con la al menos una almohadilla reactiva, opcionalmente entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable, en donde la almohadilla reveladora se localiza corriente abajo de la al menos una almohadilla reactiva, en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo y en donde la muestra se aplica en la cara superior del dispositivo y se obtiene la señal detectable de la cara superior del dispositivo y en donde el compuesto de control es un compuesto ácido capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6 y en donde la cara superior del dispositivo se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva. En una modalidad de la presente invención, la al menos una almohadilla reactiva comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito y/o un reactivo capaz de participar en la determinación del analito. El reactivo capaz de participar en la determinación del analito puede ser un reactivo que toma parte en el ensayo para proporcionar una señal detectable, pero que no se une, reacciona o interactúa directamente con el analito.

En el presente contexto, el término "ensayo químico" se refiere a la determinación de las cantidades relativas de uno o más componentes de la muestra de leche por medio de una reacción química y/o bioquímica . En una modalidad de la presente invención, el ensayo químico involucra la determinación del analito que no se basa en una determinación basada en enzimas.

Un ensayo basado en enzimas es un ensayo que depende o usa la actividad enzimática para producir una señal detectable.

Como se mencionó anteriormente el dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende al menos una almohadilla reactiva y una almohadilla reveladora en donde la al menos una almohadilla reactiva comprende el reactivo o la combinación de reactivos y la almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo o la combinación de reactivos reaccionen con el analito para proporcionar una señal detectable. En una modalidad de la presente invención el al menos un reactivo y la almohadilla reveladora se localizan en relación uno a otro de manera que pueda evitarse la precipitación de los componentes de la muestra de leche, particularmente, para evitar la precipitación de los componentes de la muestra de leche sobre la superficie, donde se realiza la lectura/determinación (del color).

En el presente contexto el término "dispuesto para evitar la precipitación" se refiere a colocar la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora de manera que se evite la precipitación de los componentes de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo de prueba de bastoncillo seco cuando se aplica la muestra. Por precipitación de los componentes de la muestra de leche se entiende los componentes de la muestra de leche de la muestra de leche fluida o parte del a muestra de leche fluida que cambia a masa sólida o semisólida, frecuentemente causado por la acción de, por ejemplo, calor o sustancias químicas. Se prefiere que la precipitación se proporcione por la acción de una sustancia química (en el presente contexto un compuesto de control).

En el presente contexto el término "cara superior" se refiere a la superficie del dispositivo de bastoncillo seco de acuerdo con la presente invención donde se aplica la muestra de leche o donde la muestra de leche se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva.

5

En una modalidad alternativa de la presente invención el término "cara superior" se refiere a la superficie del dispositivo de prueba de bastoncillo seco de la presente invención de donde se obtiene la señal detectable. Esta superficie es la misma que la superficie donde se aplica la muestra.

10

En una modalidad de la presente invención, el dispositivo de prueba de bastoncillo seco puede comprender al menos 2 almohadillas reactivas, tal como al menos 3 almohadillas reactivas, por ejemplo, al menos 4 almohadillas reactivas, tal como al menos 5 almohadillas reactivas, por ejemplo, al menos 6 almohadillas reactivas.

15

En el presente contexto, el término "componentes de la muestra" se refiere a todas las sustancias presentes en la muestra de leche al momento de realizar el ensayo, en una modalidad de la presente invención los "componentes de la muestra" pueden ser uno de los reactivos del ensayo. En una modalidad de la presente invención los componentes de la muestra de leche que pueden tender a precipitar pueden ser las proteínas de la leche, tales como las moléculas de caseína.

20

Los inventores de la presente invención proporcionaron además un nuevo método para la determinación de un analito en una muestra de leche. El método comprende las etapas de:

(a) aplicar la muestra sospechosa de contener el analito al dispositivo de prueba de bastoncillo seco, dicho dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende:

25

(i) al menos una almohadilla reactiva que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando esté en estado húmedo, y

30

(ii) en contacto con dicha al menos una almohadilla reactiva se localiza una almohadilla reveladora, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable, en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo y en donde la muestra se aplica en la cara superior del dispositivo y se obtiene la señal detectable de la cara superior del dispositivo y en donde el compuesto de control es un compuesto ácido capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6 y en donde la cara superior del dispositivo se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva

40

(b) permitir que la muestra emigre en la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora y movilizar el al menos un reactivo y el al menos un compuesto de control, y

45

(c) permitir que el al menos un reactivo y el analito, el derivado de dicho analito o el compuesto indicador para dicho analito reaccionen y proporcionen una señal detectable.

La señal detectable puede ser cualquier sustancia que directamente o indirectamente sea capaz de observarse por cualquier tipo de medio visual o instrumental. Los medios instrumentales pueden ser, por ejemplo, un magno(magne)tómetro, espectrofotómetro, lector-ELISA. Varios compuestos apropiados pueden ser adecuados como el compuesto que produce color. En la presente invención, el compuesto que produce color puede seleccionarse del grupo que consiste de cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, etiquetas radioactivas, metales, partículas magnéticas, partículas colorantes, partículas de látex de polímero orgánico, liposomas u otras vesículas que contienen sustancias que producen señales y similares.

50

55

En el presente contexto el término "en un estado húmedo" se refiere al contacto entre los reactivos en la(s) almohadilla(s) reactiva(s) y/o el compuesto de control en la almohadilla reveladora y la muestra de leche en donde la(s) almohadilla(s) reactiva(s) y/o la almohadilla reveladora se humedecen o se humedecen ligeramente. El efecto del estado húmedo es que los reactivos secos, los compuestos de control secos se liberan y disuelven (movilizan) y la reacción en el dispositivo de bastoncillo seco comienza y se produce una señal detectable, que depende de la cantidad de analito presente en la muestra de leche.

60

El material poroso

5 Los materiales seleccionados para usar en la al menos una almohadilla reactiva y/o la almohadilla reveladora pueden seleccionarse de un material poroso. En el presente contexto el término "material poroso" se refiere a un material que absorbe la muestra de leche y así permite que emigre.

10 El material poroso seleccionado puede comprender un tamaño de poro y una capacidad que hace posible proporcionar un alto régimen de flujo que disuelve rápidamente el reactivo o la combinación de reactivos y proporciona una distribución buena y sustancialmente uniforme de las muestras. Preferentemente, el material poroso puede seleccionarse para que sustancialmente no proporcione retención de muestras ricas en triglicéridos. En una modalidad de la presente invención la retención de triglicéridos es 0%, tal como a lo máximo 1%, por ejemplo, a lo máximo 2.5%, tal como a lo máximo 5%, por ejemplo, a lo máximo 10%, tal como a lo máximo 15%, por ejemplo, a lo máximo 25%, tal como a lo máximo 50%, o la retención de la mayoría o todos los triglicéridos, por ejemplo, a lo máximo 75%, tal como a lo máximo 100%.

15 El material poroso se selecciona del grupo que consiste de una membrana de nitrocelulosa, celulosa, un polímero (tal como nilón, fluoruro de polivinilideno o látex), fibra de vidrio, fibras de tejido, fibras no tejidas, una membrana de gel cromatográfica, tierra de diatomeas, gel de sílice, óxido de silicio y diatomita.

20 En una modalidad de la presente invención, el material poroso en la al menos una almohadilla reactiva y/o en la almohadilla reveladora puede seleccionarse de un grupo de materiales que comprende un tamaño de poro preferentemente en el intervalo de 1-1000 μm , tal como en el intervalo de 1-500 μm , tal como en el intervalo de 1-100 μm , por ejemplo, en el intervalo de 1-75 μm , tal como en el intervalo de 5-500 μm , tal como en el intervalo de 5-100 μm , por ejemplo, en el intervalo de 5-75 μm , tal como en el intervalo de 10-500 μm , tal como en el intervalo de 10-100 μm , por ejemplo, en el intervalo de 10-75 μm , tal como en el intervalo de 10-50 μm , por ejemplo, en el intervalo de 50-200 μm , tal como en el intervalo de 50-100 μm , por ejemplo, en el intervalo de 100-500 μm , tal como en el intervalo de 50-300 μm , por ejemplo, en el intervalo de 75-300 μm , tal como en el intervalo de 75-200 μm , por ejemplo, en el intervalo de 75-150 μm , tal como en el intervalo de 75-120 μm .

30 En aún otra modalidad de la presente invención, el material poroso en al menos una almohadilla reactiva y/o en la almohadilla reveladora puede seleccionarse de un grupo de materiales que comprende un tamaño de poro adecuado tal como a lo máximo 500 μm , por ejemplo, a lo máximo 200 μm , tal como a lo máximo 150 μm , por ejemplo, a lo máximo 100 μm , tal como a lo máximo 75 μm .

35 Preferentemente, los materiales porosos usados en la al menos una almohadilla reactiva y/o la almohadilla reveladora pueden ser los mismos en al menos 2 almohadillas, tal como al menos 3 de las almohadillas, por ejemplo, 4 de la almohadillas, tal como al menos 5 de la almohadillas.

40 De acuerdo con el material poroso anterior, puede ser deseable proporcionar un dispositivo para detectar un analito en un ensayo rápido. En una modalidad de la presente invención el tiempo de ensayo a aproximadamente 20°C puede ser menor que 20 minutos, tal como menor que 18 minutos, por ejemplo, menor que 15 minutos, tal como menor que 12 minutos, por ejemplo, menor que 10 minutos, tal como menor que 8 minutos, por ejemplo, menor que 5 minutos, tal como menor que 3 minutos, por ejemplo, menor que 2 minutos, tal como en el intervalo de 1 a 25 minutos, por ejemplo en el intervalo de 2-25 minutos, tal como en el intervalo de 5 a 20 minutos, por ejemplo en el intervalo de 8-18 minutos, tal como en el intervalo de 10 a 15 minutos, por ejemplo en el intervalo de 11-14 minutos, tal como en el intervalo de 12-13 minutos.

El soporte sólido

50 El dispositivo de acuerdo con la presente invención puede estar soportado por un soporte sólido. En el presente contexto, el término "soporte sólido" se refiere a un material que no tiene influencia en la migración en la reacción de la muestra de leche líquida o en el(los) reactivo(s) o los agentes capaces de aumentar la velocidad de la reacción. El soporte sólido proporciona una base estabilizante para el dispositivo de ensayo y proporciona suficiente fortaleza para mantener la forma física deseada y sustancialmente no tiene interferencia con la producción de una señal detectable.

55 En una modalidad de la presente invención, el material para el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de tubos, perlas poliméricas, tiras de nitrocelulosa, membranas, filtros, láminas plásticas y similares.

60 Naturalmente, los materiales sintético y de origen natural que se modifican sintéticamente pueden usarse como el material de la fase sólida. Tales materiales incluyen polisacáridos, por ejemplo, materiales celulósicos tal como, papel y derivados celulósicos, tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa, materiales inorgánicos de sílice, tal como, por ejemplo, alúmina no activada, tierra de diatomeas, MgSO_4 u otros materiales inorgánicos finamente divididos uniformemente dispersos 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, copolímero de cloruro de vinilo-propileno, y copolímero de cloruro de vinilo-acetato de vinilo, tela, de origen natural (por ejemplo, algodón) y sintético (por ejemplo, nilón), geles porosos, tal como gel de sílice, agarosa, dextrano, y gelatina, películas poliméricas, tal como poliacrilamina, y similares.

En una modalidad de la presente invención, el soporte sólido puede omitirse del dispositivo de prueba de bastoncillo seco. En este caso el dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende al menos una almohadilla reactiva y una almohadilla reveladora. Cuando se realiza una determinación de un analito usando un dispositivo de prueba de bastoncillo seco sin un soporte sólido, la muestra se aplica al dispositivo de prueba de bastoncillo seco sobre una superficie y la señal detectable puede detectarse en la misma superficie, y de ese modo se limita o elimina cualquier posible precipitación de los componentes de la muestra de leche en la superficie donde se va a detectar la señal detectable.

La almohadilla reactiva

En el presente contexto el término "almohadilla reactiva" se refiere a una o más almohadillas que comprenden un reactivo o una combinación de reactivos. El reactivo o la combinación de reactivos puede impregnarse en la almohadilla reactiva de manera que el reactivo o la combinación de reactivos se inmovilice cuando esté en estado seco y sea móvil cuando esté en estado húmedo.

En el presente contexto de la presente invención el término "reactivo" se refiere a la sustancia química 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 dicho analito para proporcionar una señal detectable. Una definición similar de la combinación de reactivos puede proporcionarse la cual se refiere más específicamente a 2 o más reactivos, tal como 3 o más reactivos, por ejemplo, 4 o más reactivos, tal como 5 o más reactivos, por ejemplo, 6 o más reactivos.

En una modalidad de la presente invención el dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende al menos 2 almohadillas reactivas, tal como al menos 3 almohadillas reactivas, por ejemplo, al menos 4 almohadillas reactivas, tal como al menos 5 almohadillas reactivas, por ejemplo, al menos 6 almohadillas reactivas. En esta modalidad 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 dicho analito para proporcionar una señal detectable puede introducirse en almohadillas reactivas diferentes. Esto puede mejorar las propiedades de estabilidad, almacenamiento y aplicabilidad del dispositivo de bastoncillo seco debido a que compuestos no compatibles pueden estar incluidos en las diferentes almohadilla reactivas del dispositivo de bastoncillo seco.

La almohadilla reveladora

En el presente contexto, el término "almohadilla reveladora" se refiere a una almohadilla capaz de regular el medio y las condiciones para la muestra de leche que comprende el analito a un medio que facilita la determinación del analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito.

En una modalidad de la presente invención, la almohadilla reveladora comprende uno o más compuestos de control capaces de aumentar la velocidad de la reacción entre el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito presente en la muestra de leche y el(los) reactivo(s). En una modalidad de la presente invención el agente de control es un ácido.

En aún otra modalidad de la presente invención, la almohadilla reveladora está en contacto con al menos una almohadilla reactiva mediante una superposición sustancialmente completa, por una superposición parcial o por la colocación adyacente a al menos una almohadilla reactiva. En una modalidad de la presente invención, la almohadilla reveladora se superpone a al menos una almohadilla reactiva 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" se refiere a dos almohadillas separadas (la almohadilla reveladora y la al menos una almohadilla reactiva) colocadas una encima de la otra. En el presente contexto el término "superposición parcial" se refiere a dos almohadillas separadas (la almohadilla reveladora y la al menos una almohadilla reactiva) que se superponen con solamente parte de la(s) almohadilla(s). Una superposición parcial de 100% se refiere a una superposición completa y una desviación de 5% del 100% de superposición completa se refiere a una superposición sustancialmente completa.

En una modalidad de la presente invención la almohadilla reveladora y la al menos una almohadilla(s) reactiva(s) se colocan adyacentes una a otra. Esto significa que las almohadillas se colocan en contacto entre sí (tocándose entre sí). Una superposición de 0% (pero en contacto) se refiere al término "colocadas adyacentes", además, una superposición de menor que 5% se considera dentro del término de "colocadas adyacentes", tal como una

superposición como máximo de 4%, por ejemplo, una superposición como máximo de 3%, tal como una superposición como máximo de 2% o por ejemplo, una superposición como máximo de 1%.

Compuesto de control

5

En la almohadilla reveladora está inmovilizado un compuesto de control. En el presente contexto el término "compuesto de control" se refiere a una sustancia que tiene la función como un propulsor o un combustible en el ensayo específico para la determinación del analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito. El compuesto de control puede ser además la sustancia química responsable de la precipitación de los componentes de la muestra o el compuesto químico que causa que los componentes de la muestra de leche no precipiten. En una modalidad de la presente invención, el compuesto de control puede separarse de al menos uno de los reactivos para mejorar la estabilidad del dispositivo de prueba de bastoncillo seco.

10

15

En aún otra modalidad de la presente invención el compuesto de control es un compuesto ácido. El compuesto de control es un compuesto ácido capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra en el dispositivo de prueba de bastoncillo seco, cuando está en estado húmedo, por debajo de pH 6, tal como por debajo de pH 5, por ejemplo, por debajo de pH 4, tal como por debajo de pH 3, por ejemplo, por debajo de pH 2, tal como por debajo de pH 1, por ejemplo, por debajo de pH 0, tal como en el intervalo de pH 0-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 0-5, tal como en el intervalo de pH 0-4, por ejemplo, en el intervalo de pH 0-3, tal como en el intervalo de pH 0-2, por ejemplo, en el intervalo de pH 0-1, tal como en el intervalo de pH 1-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 2-6, tal como en el intervalo de pH 3-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 4-6, tal como en el intervalo de pH 5-6.

20

Los analitos a determinarse

25

Un dispositivo o un método basado en los principios anteriores puede usarse para determinar una amplia variedad de analitos por la selección de compuestos colorantes adecuados conocidos por la persona con experiencia en la industria, y la invención no necesita limitarse a los ejemplos mencionados en la presente descripción.

30

En una modalidad de la presente invención, los analitos a ser ensayados pueden seleccionarse del grupo que consiste de una proteína, una grasa, un hidrato de carbono, un antibiótico, un esteroide, tal como hormonas, una vitamina, un compuesto químico, un hapteno, una célula, tal como una bacteria o tal como leucocitos, un anticuerpo, un fármaco de abuso y sangre.

35

En una modalidad de la presente invención, el analito es un compuesto químico y el compuesto químico puede seleccionarse del grupo que consiste de urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tal como acetoacetato, beta-hidroxibutirato (BHB), acetona, ácido ascórbico, nitratos, urobilinogeno, colesterol, y esteroides tal como pregnenolona, progesterona, testosterona, dihidrotestosterona, estrona, estradiol, cortisol, cortisona, aldosterona, corticosterona, androstenediona, 17 α -OH- pregnenolona, 17 α -OH- progesterona, 11-desoxi-,corticosterona, 11-desoxicortisol y deshidroepiandrosterona, hormona luteinizante o gonadotropina coriónica humana.

40

El dispositivo y el método de acuerdo con la presente invención puede ser adecuado además cuando el analito es un carbohidrato y el carbohidrato puede seleccionarse del grupo que consiste de un monosacárido, tal como glucosa o galactosa, y un disacárido, tal como lactosa.

45

En una modalidad de la presente invención el dispositivo de prueba de bastoncillo seco se usa para la determinación de urea en una muestra de leche. El dispositivo de prueba de bastoncillo seco puede comprender, opcionalmente un soporte sólido y al menos 2 almohadillas, dichas al menos 2 almohadillas comprenden (i) al menos una almohadilla reactiva que comprende o-ftalaldehído o un derivado de este, un compuesto colorante y un detergente, y (ii) una almohadilla reveladora que comprende al menos un ácido, en donde una almohadilla reveladora puede estar localizada corriente abajo de la al menos una almohadilla reactiva. En esta modalidad el compuesto ácido es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra en el dispositivo de prueba de bastoncillo seco, cuando está en estado húmedo por debajo de pH 6, tal como por debajo de pH 5, por ejemplo, por debajo de pH 4, tal como por debajo de pH 3, por ejemplo, por debajo de pH 2, tal como por debajo de pH 1, por ejemplo, por debajo de pH 0, tal como en el intervalo de pH 0-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 1-5, tal como en el intervalo de pH 1-4, por ejemplo, en el intervalo de pH 1-3, tal como en el intervalo de pH 1-2, por ejemplo, en el intervalo de pH 2-6, tal como en el intervalo de pH 3-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 4-6, tal como en el intervalo de pH 5-6. Preferentemente, la al menos una almohadilla reactiva está en contacto con la almohadilla reveladora por superposición sustancialmente completa, por superposición parcial o por colocación adyacente. Se prefiere además que la almohadilla reveladora pueda localizarse entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva.

60

La muestra de leche a analizar

Para humedecer el material poroso usado en la almohadilla reveladora y/o en la al menos una almohadilla reactiva para permitir la migración, la muestra de leche líquida es leche líquida aplicada. Además, se prefiere que sea necesario un número mínimo de etapas de manipulación de la muestra de leche líquida antes de aplicarla al el dispositivo de prueba de bastoncillo seco. En el presente contexto, el término "etapas de manipulación" se refiere a cualquier tipo de pre-tratamiento de la muestra de leche líquida antes o después que se ha aplicado al dispositivo de ensayo. Este pre-tratamiento comprende separación, filtración, dilución, destilación, concentración, inactivación de compuestos interferentes, centrifugación, calentamiento, fijación, adición de reactivos, o tratamiento químico.

En una modalidad de la presente invención, la muestra de leche puede recolectarse de un mamífero, preferentemente el mamífero se selecciona del grupo que consiste de animales de manada, vacas, camellos, búfalos, cerdos, caballos, ciervo, cordero, cabras, mascotas, perros, gatos y humanos.

En una modalidad de la presente invención, la muestra es leche.

En una modalidad preferida de la presente invención se proporciona un dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de un analito en una muestra de leche por medio de un ensayo químico. El dispositivo comprende:

(i) opcionalmente un soporte sólido,

(ii) al menos una almohadilla reactiva que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando está en estado húmedo,

(iii) una almohadilla reveladora que se localiza en contacto con la al menos una almohadilla reactiva, opcionalmente entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable,

en donde la al menos una almohadilla reactiva es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche de 6 o por encima de 6, y el compuesto de control presente en la almohadilla reveladora es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6, en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo, en donde la muestra se aplica en la cara superior del dispositivo y se obtiene la señal detectable de la cara superior del dispositivo y en donde la cara superior del dispositivo se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva. En esta modalidad, el compuesto ácido es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra en el dispositivo de prueba de bastoncillo seco cuando está en estado húmedo en el intervalo de pH 1-5, tal como en el intervalo de pH 1-4, por ejemplo, en el intervalo de pH 1-3, tal como en el intervalo de pH 1-2, por ejemplo, en el intervalo de pH 2-5, tal como en el intervalo de pH 3-5, por ejemplo, en el intervalo de pH 4-5, tal como en el intervalo de pH 5-6. Preferentemente, la al menos una almohadilla reactiva está en contacto con la almohadilla reveladora por superposición sustancialmente completa, por superposición parcial o por colocación adyacente. Se prefiere además que la almohadilla reveladora pueda localizarse entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva.

El compuesto auxiliar

Debido a la complejidad de las muestras de leche líquida a ser analizadas en la presente invención puede ser ocasionalmente una ventaja usar un compuesto auxiliar para mejorar el flujo y la adsorción de la muestra de leche líquida en la almohadilla de regulación y/o in la una o más almohadilla(s) reactiva(s) y para proporcionar una liberación rápida, consistente y uniforme del(de los) reactivo(s) y los agentes capaces de aumentar la velocidad de reacción. El compuesto auxiliar puede suministrarse al dispositivo por a) añadirlo a la al menos una almohadilla(s) reactiva(s) y/o almohadilla de regulación solo o junto con la muestra de leche líquida, b) incorporar el compuesto auxiliar en al menos una de la(s) almohadilla(s) reactiva(s) y/o la almohadilla de regulación, o c) una combinación de estas.

En una modalidad de la presente invención, el compuesto auxiliar se añade al dispositivo de bastoncillo seco antes que se añada la muestra de leche líquida. Preferentemente, el compuesto auxiliar es un líquido.

En otra modalidad preferida de la presente invención, el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se añaden al dispositivo de bastoncillo seco en capas. En el presente contexto, el término "capas" se refiere a la división del volumen del compuesto auxiliar y el volumen de la muestra de leche líquida, y después el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se añaden a la primera zona uno después de otro. En este caso, el compuesto auxiliar puede añadirse como un líquido así como un compuesto sólido. En una modalidad de la presente invención, el compuesto auxiliar y la

muestra de leche líquida se dividen en al menos 2 volúmenes donde cada uno proporciona 4 capas alternas del compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida, por ejemplo, el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se dividen en al menos 3 volúmenes donde cada uno proporciona 6 capas alternas del compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida, tal como el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se divide en al menos 4 volúmenes donde cada uno proporciona 8 capas alternas del compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida, por ejemplo, el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se dividen en al menos 6 volúmenes donde cada uno proporciona 12 capas alternas del compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida, tal como el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se dividen en al menos 8 volúmenes donde cada uno proporciona 16 capas alternas del compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida, por ejemplo, el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se dividen en al menos 10 volúmenes donde cada uno proporciona 20 capas alternas del compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida, tal como el compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida se dividen en al menos 20 volúmenes donde cada uno proporciona 40 capas alternas del compuesto auxiliar y la muestra de leche líquida.

En aún una modalidad de la presente invención el compuesto auxiliar puede impregnarse en al menos una almohadilla(s) reactiva(s) y/o en la almohadilla de regulación.

En otra modalidad de la presente invención al menos una almohadilla reactiva y/o la almohadilla reveladora que incorpora al menos un compuesto auxiliar capaz de mejorar el flujo de la muestra de leche líquida.

En aún otra modalidad de la presente invención el compuesto auxiliar proporciona una liberación rápida, consistente y homogénea del(de los) reactivo(s) en la al menos una almohadilla reactiva y/o el agente capaz de aumentar la velocidad de reacción en la almohadilla reveladora. Además, el compuesto auxiliar proporciona baja afinidad por la unión a la proteína.

Además, el compuesto auxiliar puede proporcionar baja retención de muestras ricas en triglicéridos y/o disminuir la viscosidad de la muestra.

En una modalidad de la presente invención el compuesto auxiliar contiene constituyentes químicos seleccionados del grupo que consiste de agua, un surfactante, una sal, un metal, un azúcar, una proteína, un disolvente y un lípido.

30

Preparación del bastoncillo seco

El dispositivo de bastoncillo seco de acuerdo con la presente invención puede prepararse por cualquiera de los métodos convencionales previstos para la preparación de dispositivos de bastoncillo seco. En una modalidad preferida el método para proporcionar un dispositivo de bastoncillo seco de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de:

35

(i) proporcionar al menos una almohadilla reactiva impregnando un primer material poroso con una solución acuosa que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando esté en estado húmedo,

40

(ii) después de eso secar la al menos una almohadilla reactiva,

(iii) proporcionar una almohadilla reveladora impregnando un segundo material poroso con una solución acuosa que comprende al menos un compuesto de control el cual, cuando está en estado húmedo, es capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable,

45

(iv) después de eso secar el segundo material poroso impregnado

(v) inmovilizar el primer material poroso con el segundo material poroso, opcionalmente en un soporte sólido, para obtener el dispositivo de bastoncillo seco.

50

En una modalidad de la presente invención la al menos una almohadilla reactiva se localiza en relación con la almohadilla reveladora para evitar la precipitación de la muestra del componente de leche en la cara superior del dispositivo. Preferentemente, la almohadilla reveladora se localiza entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva. El componente de la muestra de leche como se describió antes puede seleccionarse del grupo que consiste de proteínas, carbohidrato, grasa, células, u otros componentes presentes en la muestra.

55

En aún una modalidad de la presente invención el primer material poroso puede impregnarse con o-ftalaldehído o un derivado de este y un compuesto colorante. Además, el primer material poroso puede impregnarse además con un detergente.

60

En otra modalidad de la presente invención el primer material poroso puede comprender 1, 2 o 3 materiales porosos

diferentes que tengan 3, 2 o 1 reactivo impregnado, respectivamente. Los reactivos en esta modalidad se seleccionan de o-ftalaldehído o un derivado de este, un compuesto colorante y un detergente.

5 En una modalidad de la presente invención el segundo material poroso puede impregnarse con un ácido. Dicho ácido puede ser capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra en el dispositivo de prueba de bastoncillo seco, cuando está en estado húmedo por debajo de pH 6, tal como por debajo de pH 5, por ejemplo, por debajo de pH 4, tal como por debajo de pH 3, por ejemplo, por debajo de pH 2, tal como por debajo de pH 1, por ejemplo, por debajo de pH 0, tal como en el intervalo de pH 0-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 0-5, tal como en el intervalo de pH 0-4, por ejemplo, en el intervalo de pH 0-3, tal como en el intervalo de pH 0-2, por ejemplo, en el intervalo de pH 0-1, tal como en el intervalo de pH 1-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 2-6, tal como en el intervalo de pH 3-6, por ejemplo, en el intervalo de pH 4-6, tal como en el intervalo de pH 5-6

15 En una modalidad de la presente invención el segundo material poroso puede impregnarse con uno o más reactivos capaces de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando esté en estado húmedo, preferentemente junto con el compuesto de control.

Modalidades adicionales

20 En una modalidad el dispositivo de prueba de bastoncillo seco de acuerdo con la presente invención se usa para la determinación de un analito en una muestra de leche. Preferentemente, el analito se selecciona del grupo que consiste de una proteína, una grasa, un carbohidrato, un antibiótico, un esteroide, una vitamina y un compuesto químico. Preferentemente, el compuesto químico se selecciona del grupo que consiste de urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tal como acetoacetato, beta-hidroxibutirato (BOHB), ácido ascórbico (ácido cítrico) y acetona. Si el analito es un carbohidrato el carbohidrato puede seleccionarse del grupo que consiste de glucosa y lactosa.

Determinación de urea

25 Como se mencionó anteriormente la determinación de la utilización de proteína puede ser un parámetro importante. Como es el caso en la cría de ganado, es muy importante que los animales (por ejemplo, las vacas) utilicen de manera óptima la proteína contenida en la alimentación, ya que la proteína es uno de los componentes más caros de la alimentación. La utilización depende, entre otros, de la cantidad de energía y proteína simultáneamente presente en el animal.

35 La nueva construcción del dispositivo de prueba de bastoncillo seco de acuerdo con la presente invención puede ser muy útil para la determinación cualitativa y cuantitativa de urea en una muestra de leche. La una o más almohadilla(s) reactiva(s) del dispositivo de prueba de bastoncillo seco puede(n) estar impregnada(s) con o-ftalaldehído o un derivado de este y un compuesto colorante y opcionalmente un detergente, tal como un alquil fenil éter de polioxietileno o un alquil éter de polioxietileno.

40 El derivado de o-ftalaldehído de la presente invención se refiere a un compuesto que se convierte a o-ftalaldehído después que el derivado se disuelve en la muestra de leche. El derivado incluye o-ftalaldehído glicerol acetal.

45 El compuesto colorante incluye N-1-naftilo etilendiamina, N-1-naftilo-N'-dietiletilendiamina y una sal de estos, tal como sales de ácido clorhídrico o ácido oxálico se incluyen.

50 El detergente puede ser un alquil fenil éter de polioxietileno o un alquil éter de polioxietileno tal como polioxietileno(9.5)p-t-octilfeniléter (HLB: 13.5; nombre comercial: TRITON X-100), polioxietileno(40)p-t-octilfeniléter (HLB: 17.9; nombre comercial: TRITON X-405), polioxietileno(20)octilfeniléter (HLB: 16.2; nombre comercial: NISSAN NONION HS-220), polioxietileno(23)lauriléter (HLB: 15.3; nombre comercial: Brij35), polioxietileno(20)palmitiléter (HLB: 15.7; nombre comercial: Brij58), polioxietileno(20)lauriléter (HLB: 16.2; nombre comercial: NISSAN NONION K-220), polioxietileno(20)esteariléter (HLB: 15.3; nombre comercial: NISSAN NONION S-220), etcétera.

55 El alquil fenil éter de polioxietileno o alquil éter de polioxietileno de la presente invención puede tener un HLB de 8 o más. En el presente contexto, el término "HLB" se refiere al balance hidrófilo-lipófilo del surfactante. Esto proporciona una indicación de la porción hidrófila de la molécula. Más grupos hidrófilos permiten más solubilidad en agua ya que existen más enlaces hidrógeno allí.

60 En una modalidad de la presente invención, la almohadilla reveladora se impregna con un ácido necesario para la determinación de urea. El ácido usado puede ser cualquier tipo de ácido capaz de proporcionar y mantener un valor de pH de 2,0 o inferior cuando se disuelve por la muestra líquida. Particularmente, dichos ácidos incluyen el ácido 4-sulfotálico o un polímero ácido.

La cantidad respectiva de o-ftalaldehído o sus derivados, el compuesto colorante (en la al menos una almohadilla

reactiva) y el ácido (en la almohadilla reveladora) puede ser la cantidad necesaria para la determinación de urea en el ensayo específico. Esto significa que las cantidades son similares a las usadas convencionalmente para el o-ftalaldehído o sus derivados, el compuesto colorante y el ácido en la determinación cuantitativa de urea. Normalmente, pero sin limitarse a lo anterior, la cantidad de o-ftalaldehído o sus derivados está en el intervalo suficiente para proporcionar una cantidad de 0,05M - 2M cuando el o-ftalaldehído o sus derivados se disuelven en la muestra de leche. La cantidad de adición proporcionada en la almohadilla reveladora puede ser suficiente para proporcionar y mantener el valor de pH de la muestra de leche en 2,0 o inferior, cuando la muestra de leche se disuelve en la muestra.

La cantidad de detergente puede ser suficiente para proporcionar una cantidad de 0,1-20% (p/v) cuando el detergente empieza a disolverse en la muestra de leche, tal como en una cantidad de 0,1 - 10% (p/v), por ejemplo, en una cantidad de 4-10% (p/v). En una modalidad de la presente invención, la cantidad de detergente, cuando se disuelve en la muestra de leche, puede calcularse en base a la capacidad de la muestra mantenida en el dispositivo de prueba de bastoncillo seco.

Otros aditivos conocidos pueden añadirse al dispositivo de prueba de bastoncillo seco que incluye estabilizadores, tal como un surfactante etc. El surfactante puede usarse para mejorar la extensibilidad y solubilidad de la muestra de leche y mejorar las propiedades de recubrimiento de la(s) solución(es) líquida(s) después de la producción. En una modalidad de la presente invención la cantidad de un surfactante especificado puede ser la misma que la cantidad usada convencionalmente.

La estructura del dispositivo de prueba de bastoncillo seco de la presente invención no está limitada excepto que debe contener o-ftalaldehído o sus derivados, un compuesto colorante y un ácido separado en al menos una almohadilla reactiva y una almohadilla reveladora en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo. El dispositivo de prueba de bastoncillo seco de la presente invención puede producirse de una manera similar a la producción de piezas de prueba convencionales para medir urea o como es descrito en este documento.

En una modalidad de la presente invención el dispositivo de prueba de bastoncillo seco puede proporcionarse con una pluralidad de almohadillas reactivas donde diferente(s) reactivo(s) está/están comprendidos en cada almohadilla reactiva. Además, puede proveerse una almohadilla intermedia entre las pluralidades de almohadillas reactivas. En aún una modalidad de la presente invención los reactivos pueden no estar todos comprendidos en al menos una almohadilla reactiva, pero uno o más de los reactivo(s) pueden estar comprendidos en la almohadilla reveladora.

En la figura 1, se proporciona un ejemplo de la pieza de prueba de bastoncillo seco. La pieza de prueba de bastoncillo seco comprende un soporte sólido (1) que tiene en un extremo una sección reactiva (2). La sección reactiva (2) comprende una almohadilla reveladora (3) localizada en el soporte sólido (1) y en la parte superior de la almohadilla reveladora (3) está una almohadilla reactiva (4). En este ejemplo, la muestra de leche se aplica a la almohadilla reactiva (4) y los reactivos (comprendidos en ella se disuelven y migran a través de la almohadilla reactiva y a la almohadilla reveladora (4) disolviendo así el ácido comprendido en ella y la reacción para determinar los progresos de la urea.

Cuando una cantidad predeterminada de una muestra de leche se gotea sobre la almohadilla reactiva (4) de la pieza de prueba de bastoncillo seco (1), la muestra se extiende primero uniformemente sobre la superficie entera y a través de toda la almohadilla reactiva (4). La muestra extendida alcanza la almohadilla reveladora (4) en donde el ácido comprendido en la almohadilla reveladora (4) se disuelve y procede la reacción. La determinación de urea comprendida en la muestra de leche reacciona con o-ftalaldehído o sus derivados presentes en la almohadilla reactiva (4) para producir 1,3-dihidroxiisoinndrina (DHI). El ion carbonio del DHI resultado reacciona con un compuesto colorante de la almohadilla reactiva (4) bajo condiciones ácidas, proporcionadas por el presente compuesto en la almohadilla reveladora (3), para producir una señal detectable - un color. Con el progreso de la reacción, los reactivos comprendidos en la almohadilla reactiva (4) y el ácido comprendido sustancialmente se disuelven completamente y se dispersan en la almohadilla reveladora (3) disolviendo así el ácido comprendido en ella, y la almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora forman en conjunto una almohadilla de detección.

Es obvio para aquellos con experiencia en la industria que el compuesto de control y la construcción del dispositivo de prueba de bastoncillo seco puede cambiar en base al concepto de la presente invención, si se proporciona un ensayo diferente o si se va a ensayar otro analito.

Además, es obvio también para la persona con experiencia en la industria cómo seleccionar el compuesto de control para optimizar la construcción del dispositivo de prueba de bastoncillo seco basado en el conocimiento proporcionado por el concepto de la presente invención, específicamente, separar el compuesto de control de los reactivos (al menos alguno de ellos) en diferentes almohadillas y posteriormente disponer estas almohadillas para evitar la precipitación de los componentes de la muestra de leche, con lo que puede limitarse o evitarse la influencia de la señal detectada.

El concepto de la presente invención se ilustrará más aún en las siguientes figuras no limitantes y los ejemplos.

Descripción de los figuras

La Fig. 1 muestra una posible construcción del dispositivo de prueba de bastoncillo seco de acuerdo con la presente invención donde (1) se refiere al dispositivo de prueba de bastoncillo seco, (2) se refiere a la sección reactiva, (3) se refiere a la almohadilla reveladora y (4) se refiere a la almohadilla reactiva.

La Fig. 2 muestra el dispositivo de prueba de bastoncillo seco en donde la almohadilla reactiva se coloca en la parte superior de la almohadilla reveladora y los dispositivos de prueba de bastoncillo seco en donde la almohadilla reveladora se coloca sobre la almohadilla reactiva. Las figuras muestran diferente grados de precipitación de la leche (manchas blancas) en la almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora respectivamente.

La Fig. 3 muestra una ampliación de la almohadilla reactiva izquierda superior de la figura 2.

Ejemplos

Ejemplo 1: Influencia de la precipitación en la difusión de la luz en los bastoncillos secos para urea

Montaje experimental:

Las almohadillas que comprenden una capa inferior muy acídica (almohadilla reveladora) y una almohadilla con la capa superior seca) se montan con la almohadilla reveladora arriba o con la almohadilla reactiva arriba. Se aplican las muestras de leche y se describe la distribución de la leche en las almohadillas. Al final de la incubación / reacción las almohadillas se escanean y se mide el color verde para calcular la influencia de la precipitación en la difusión de la luz en las almohadillas.

Preparación de bastoncillos secos para urea:

Se emplean bastoncillos secos para urea (almohadillas en marcos plásticos, número de lote 20060928-1, producidos de acuerdo con "Producción de bastoncillos para UREA ver. 4.0.2") que comprenden almohadillas de 5x5 mm². Dichas almohadillas consistente de dos capas pegadas juntas, que comprenden:

1. una capa superior que comprende papel de filtro impregnado con Triton X-405, oxalato de N,N-dietil-N'-1-naftil-etilendiamina, el acetal de glicerina y orto-ftaldialdehído (almohadilla reveladora) y,
2. una capa inferior consistente de tela tejida (nilón/PET) impregnada con ácido 4-sulfoftálico (almohadilla reactiva).

Las capas pegadas se cortan en almohadillas cuadradas, 5 por 5 mm² y se colocan en marcos plásticos con la almohadilla reveladora en la parte superior de la almohadilla reactiva (montada invertida) o con la almohadilla reactiva en la parte superior de la almohadilla reveladora (montada correctamente).

Preparación de muestras de leche:

Dos muestras de leche (en lo adelante enumeradas #11 y #14) se enriquecieron con 500 mg/ml de urea.

Prueba de desempeño de los bastoncillos secos para urea montados correctamente e invertidos:

Cuatro bastoncillos montados correctamente y cuatro bastoncillos invertidos se sujetaron por una cinta.

8 µl de leche #11 y 8 µl de leche #14 se aplicaron en dos bastoncillos secos para urea invertidos separadamente y en dos bastoncillos secos para urea montados correctamente separadamente. Después de la incubación a 25°C en 12 minutos y 30 segundos cada bastoncillo seco para urea se escaneó invertido con un escáner Canon ConoScan "2400U.

En los bastoncillos secos para urea que comprenden las almohadillas montadas correctamente, la leche se extiende fácilmente y entra libremente en la almohadilla. Después de la incubación el color se extiende uniformemente sobre toda la superficie. En los bastoncillos secos para urea que comprenden las almohadillas montadas invertidas, los 8 µl de leche permanecen como una gota pequeña, liberando lentamente el líquido en la almohadilla. Posterior a la incubación los constituyentes de la leche coagulada (proteína ("queso") con glóbulos de grasa) permanecen en la superficie de la almohadilla, formando una mancha blanca que cubre aproximadamente 2/3 del área (Ver las figuras 2 y 3).

Cada una de las ocho almohadillas escaneadas (con 300 puntos por pulgada) se midió usando el programa Matlab, un programa de rutina que usa color rojo, verde y azul. El campo medido en cada bastoncillo seco para urea constituye aproximadamente 4x4 mm² ya que los bordes de las almohadillas se excluyeron.

ES 2 389 196 T3

En la tabla más abajo se muestran los valores de color verde.

Orientación de la almohadilla			Promedio de	Desviación estándar de pixeles (color verde)
Almohadilla reveladora arriba "invertida"	primera #14	muestra	213,2	25,6
	segunda #14	muestra	209,7	30,1
	primera #11	muestra	205,3	35,4
	segunda #11	muestra	194,5	36,6
Almohadilla reactiva arriba "correcta"	primera #14	muestra	204,3	5,1
	segunda #14	muestra	213,7	8,7
	primera #11	muestra	206,1	5,8
	segunda #11	muestra	199,4	5,1

Conclusión:

5 Los resultados anteriores muestran claramente que la desviación estándar de pixeles (color verde) es significativamente superior (5-6 veces) cuando las almohadillas se orientan con la almohadilla reveladora arriba (almohadillas montadas invertidas) comparado con las almohadillas con la almohadilla reactiva arriba (almohadillas montadas correctamente).
 10 Los resultados muestran que el color producido no se distribuye uniformemente lo que provoca lecturas falsas del bastoncillo cuando las almohadillas se montan invertidas y confirma que los coágulos/precipitados de leche influyen significativamente en el ensayo e influyen significativamente en el desempeño del bastoncillo seco.

Referencias

15 US 4,125,995
 JP 10-229023

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de un analito en una muestra de leche por medio de un ensayo químico, dicho dispositivo comprende:

(i) opcionalmente un soporte sólido,

(ii) al menos una almohadilla reactiva que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando está en estado húmedo,

10 (iii) una almohadilla reveladora que se localiza en contacto con la al menos una almohadilla reactiva, opcionalmente entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable, en donde la almohadilla reveladora se localiza corriente abajo de la al menos una almohadilla reactiva

15 en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo y en donde la muestra se aplica en la cara superior del dispositivo y se obtiene la señal detectable de la cara superior del dispositivo y en donde el compuesto de control es un compuesto ácido capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6 y en donde la cara superior del dispositivo se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva.

- 20 2. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la al menos una almohadilla reactiva comprende o-ftalaldehído o un derivado de este, un compuesto colorante y un detergente.

- 25 3. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el analito se selecciona del grupo que consiste de una proteína, una grasa, un carbohidrato tal como monosacáridos, tal como glucosa o galactosa y disacáridos, tal como lactosa, un antibiótico, un esteroide, una vitamina, y un compuesto químico tal como urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tal como acetoacetato, beta-hidroxitbutirato (BOHB), ácido cítrico, ácido láctico y acetona.

- 30 4. Un dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de un analito en una muestra de leche por medio de un ensayo químico, dicho dispositivo comprende:

35 (i) opcionalmente un soporte sólido,

(ii) al menos una almohadilla reactiva que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando está en estado húmedo,

40 (iii) una almohadilla reveladora que se localiza en contacto con la al menos una almohadilla reactiva, opcionalmente entre el soporte sólido y la al menos una almohadilla reactiva, dicha almohadilla reveladora comprende al menos un compuesto de control capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable, en donde la almohadilla reveladora se localiza corriente abajo de la al menos una almohadilla reactiva

45 en donde la al menos una almohadilla reactiva es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche de 6 o por encima de 6, y el compuesto de control presente en la almohadilla reveladora es capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6, en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo, en donde la muestra se aplica en la cara superior del dispositivo y se obtiene la señal detectable de la cara superior del dispositivo y en donde la cara superior del dispositivo se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva.

- 50 5. Un dispositivo de prueba de bastoncillo seco para la determinación de urea en una muestra de leche, dicho dispositivo de prueba de bastoncillo seco comprende opcionalmente un soporte sólido y al menos 2 almohadillas, dichas al menos 2 almohadillas comprenden (i) al menos una almohadilla reactiva que comprende o-ftalaldehído o un derivado de este, un compuesto colorante y un detergente, y (ii) una almohadilla reveladora que comprende al menos un compuesto ácido capaz de proporcionar un valor de pH de la muestra de leche por debajo de 6, en donde la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora se disponen para evitar la precipitación del(de los) componente(s) de la muestra de leche en la cara superior del dispositivo, en donde la muestra se aplica en la cara superior del dispositivo y se obtiene la señal detectable de la cara superior del dispositivo y en donde la cara superior del dispositivo se relaciona con la superficie donde la muestra se pone inicialmente en contacto con la al menos una almohadilla reactiva.

6. Un método para la preparación del dispositivo de bastoncillo seco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, dicho método comprende las etapas de:

5 (i) proporcionar al menos una almohadilla reactiva impregnando un primer material poroso con una solución acuosa que comprende un reactivo capaz de reaccionar con el analito, un derivado de dicho analito o un compuesto indicador para dicho analito para proporcionar una señal detectable cuando esté en estado húmedo,
10 (ii) después de eso secar la al menos una almohadilla reactiva,
(iii) proporcionar una almohadilla reveladora impregnando un segundo material poroso con una solución acuosa que comprende al menos un compuesto de control el cual, cuando está en estado húmedo, es capaz de proporcionar una condición requerida para que el reactivo reaccione con el analito para proporcionar una señal detectable,
15 (iv) después de eso secar el segundo material poroso impregnado, y
(v) inmovilizar el primer material poroso con el segundo material poroso, opcionalmente en un soporte sólido, para obtener el dispositivo de bastoncillo seco.

7. Un método para la determinación de un analito en una muestra de leche, dicho método comprende las etapas de:

20 (a) aplicar la muestra sospechosa de contener el analito a un dispositivo de prueba de bastoncillo seco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6,
25 (b) permitir que la muestra emigre en la al menos una almohadilla reactiva y la almohadilla reveladora y movilizar el al menos un reactivo y el al menos un compuesto de control, y
(c) permitir que el al menos un reactivo y el analito, el derivado de dicho analito o el compuesto indicador para dicho analito reaccionen y proporcionen una señal detectable

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el analito se selecciona grupo que consiste de una proteína, una grasa, un carbohidrato tal como glucosa y lactosa, un antibiótico, un esteroide, una vitamina, un compuesto químico tal como urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tal como acetoacetato, beta-hidroxibutirato (BOHB) y acetona.

9. Uso de un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la determinación de un analito en una muestra de leche.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el analito se selecciona del grupo que consiste de una proteína, una grasa, un carbohidrato, un antibiótico, un esteroide, una vitamina y un compuesto químico.

11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el compuesto químico se selecciona del grupo que consiste de urea, triglicérido y cuerpos cetónicos, tal como acetoacetato, beta-hidroxibutirato (BOHB) y acetona.

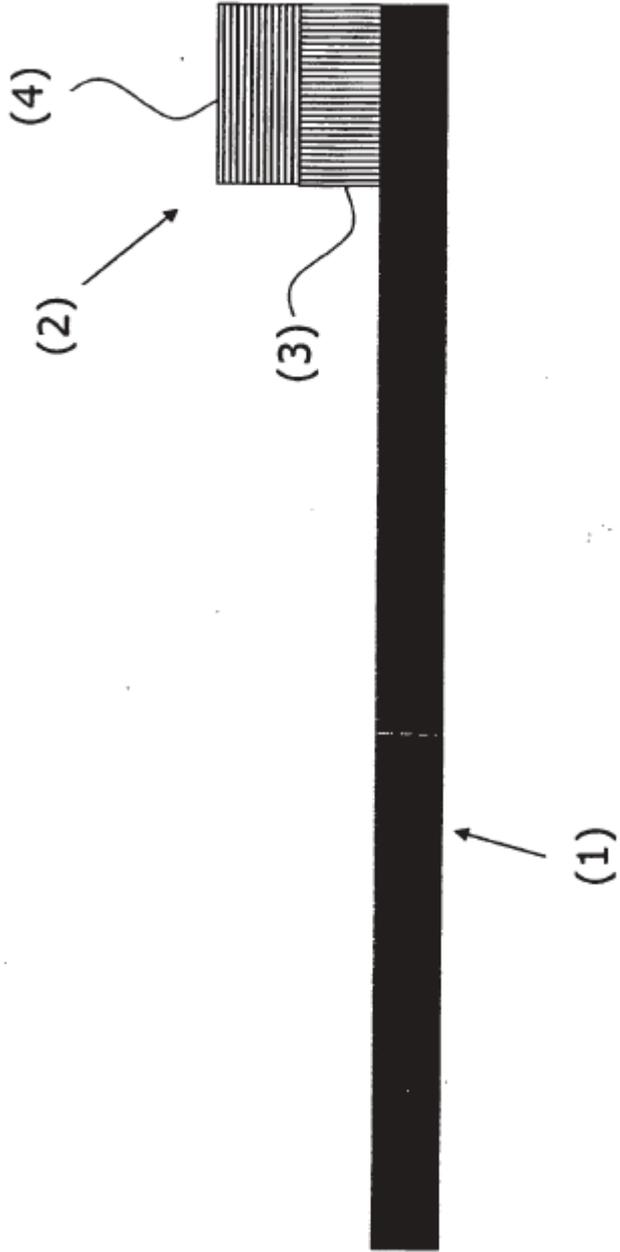


Fig. 1

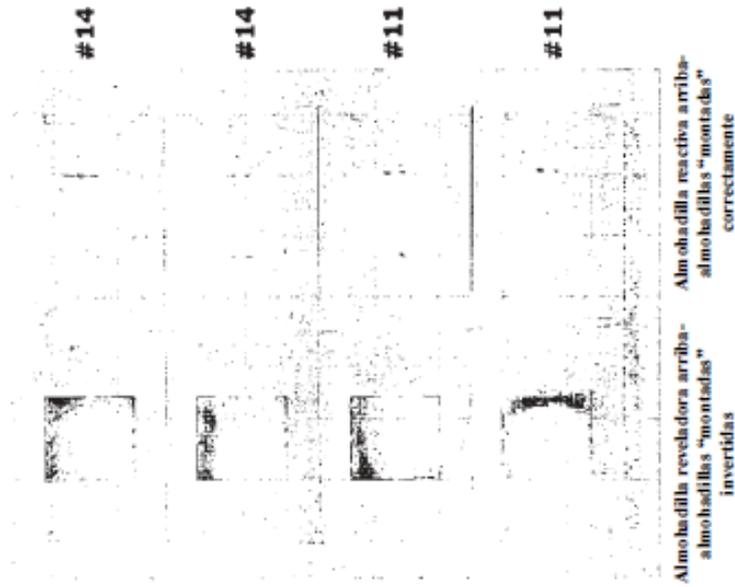


Fig. 2

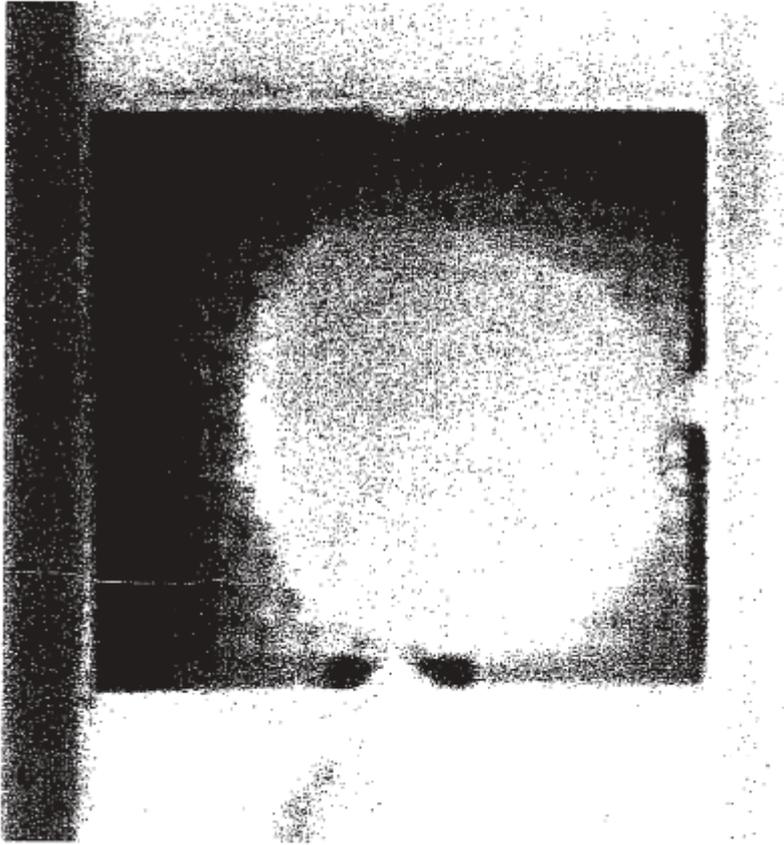


Fig. 3