



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 255**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02738447 .8**

86 Fecha de presentación : **21.06.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1405080**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54

Título: **Métodos y dispositivos para la detección de proteínas totales a pH bajo.**

30

Prioridad: **25.06.2001 US 300104 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73

Titular/es: **Siemens Healthcare Diagnostics Inc.**
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York 10591, US

72

Inventor/es: **Profitt, James, A.;**
Orn, Alexander, H. y
Farr, Jennifer

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 305 255 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

Métodos y dispositivos para la detección de proteínas totales a pH bajo.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general a métodos y a dispositivos para la detección de proteínas. De manera específica la invención está dirigida a métodos y a dispositivos para la detección de proteínas a valores bajos de pH con la utilización de diversos tampones.

10 Fundamento de la invención

Los métodos para la detección de las proteínas de la orina son frecuentemente más sensibles con respecto a la albúmina que con respecto a otras proteínas de la orina. Sin embargo, es importante detectar otras proteínas diferentes de la albúmina, especialmente en el caso de la proteinuria Bence-Jones. La detección de las proteínas debería cubrir un amplio rango de concentraciones de proteína puesto que la decisión de los niveles y las acciones recomendadas, que deben ser tomadas por el personal clínico, variará en función de la concentración de proteína detectada en la orina de un paciente. A título de ejemplo, una proteinuria persistente mayor que 50 mg/dL representa una fuerte evidencia de enfermedad renal, mientras que un nivel en proteína mayor que 300 mg/dL es consistente con un diagnóstico de síndrome nefrótico. Una concentración de proteína en la orina mayor que 800 mg/dL sugiere una pérdida masiva de proteína y justifica una biopsia renal y/o una terapia con esteroides. Por lo tanto, es evidente que un ensayo de proteína en la orina debe ser efectivo a través de un amplio rango de valores de proteína.

Se han descrito en la literatura diversos métodos para la determinación de proteína en líquidos acuosos. Estos métodos incluyen el método de Kjeldahl, el método al biuret, el método de Lowery, el método de la combinación de colorantes, el método con UV y el método fluorométrico. En general las proteínas reaccionan con diversas sustancias, con inclusión de los colorantes tales como el azul de bromofenol, el azul brillante de Coomassie y la eosina, así como iones metálicos tales como la plata (I), el cobre (II), el cinc (II) y el plomo (II).

La orina contiene cantidades de sales que varía de un individuo a otro. Algunas de estas sales pueden actuar a modo de tampón cuando un análisis de diagnóstico requiera operar a un pH diferente del correspondiente al de la muestra de orina. A título de ejemplo, la muestra de orina con sales, tales como bicarbonato, acetato o fosfato, tiende a resistir la disminución del pH. La creatinina, que es un componente común de la orina, puede actuar también a título de tampón resistiendo la disminución del pH. El resultado del tamponamiento consiste en que algunas muestras de orina provocarán un desplazamiento del pH a valores superiores al óptimo. Un desplazamiento del pH mayor que el óptimo puede dar como resultado la generación de un color del colorante indicador de la proteína, proporcionando una falsa indicación de la presencia de proteína. Es deseable tener un sistema tampón que reduzca tales efectos de la orina, en tanto en cuanto no interaccione con el acontecimiento químico.

Por lo tanto, existe la necesidad de un método y un dispositivo para detectar proteínas a través de un amplio rango de concentraciones clínicas y de valores del pH.

Sumario de la invención

De conformidad con una realización, un análisis para la determinación de proteína en un fluido de ensayo acuoso comprende la combinación del fluido de ensayo con un tampón y con un colorante. El tampón se elige entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina, o combinaciones de los mismos. El tampón se añade en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, que incluye el fluido de ensayo en un rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, comprendido en un rango que se extiende desde aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 3,0. El colorante tiene un pKa que le permite operar como un indicador de proteína en el rango de pH, que ha sido predeterminado. El colorante tiene una afinidad para la proteína tal, que proporcionará una respuesta detectable en presencia de una cantidad mayor que 15 mg/dL de proteína, para que el análisis sea adecuado, de este modo, para la detección de la proteína total en el fluido de ensayo.

De conformidad con otra realización, un dispositivo seco para el empleo en la determinación de niveles de proteína en una muestra de ensayo líquida comprende un material absorbente que tiene absorbido un tampón y un colorante. El tampón se elige entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos. El tampón se añade en una cantidad suficiente para mantener el pH del análisis con inclusión del fluido de ensayo en un rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, situado en un rango que se extiende desde aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 3,0. El colorante tiene un pKa que le permite operar como un indicador de proteína en el rango de pH predeterminado. El colorante tiene una afinidad para la proteína tal, que proporcionará una respuesta detectable en presencia de una cantidad mayor que 15 mg/dL de proteína tras el contacto entre el dispositivo y la muestra de ensayo líquida, para que el dispositivo sea adecuado, de este modo, para la detección de la proteína total en la muestra de ensayo líquida.

ES 2 305 255 T3

Descripción detallada de la realización ilustrada

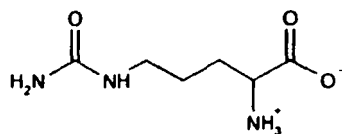
El análisis de proteína de la presente invención puede llevarse a cabo bien en formato seco o bien en formato húmedo. Éste se lleva a cabo de una manera más conveniente en forma de una tira de ensayo absorbente impregnada con (a) un tampón elegido entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o una combinación de los mismos, y (b) un colorante que tenga un pKa que le permita operar como indicador de proteína (por ejemplo un indicador mediante el color) a un pH comprendido entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 3,0.

Tampones

El tampón que debe ser usado en la presente invención se añade en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, con inclusión del fluido de ensayo, dentro de un rango comprendido entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 3,0. El tampón puede sufrir un ajuste previo del pH que se lleva a cabo de manera común por adición de ácido o de base a una solución del tampón químico para alcanzar un pH particular, o mediante la adición de una mezcla del tampón químico y de su sal en proporciones seleccionadas para proporcionar un pH particular. El tampón se añade, de manera preferente, para mantener el pH del análisis, con inclusión del fluido de ensayo, con una aproximación de +/- 0,2 unidades de pH dentro del pH seleccionado, que ha sido predeterminado. El tampón se añade, de manera preferente, en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, con inclusión del fluido de ensayo, dentro de un rango comprendido entre aproximadamente 2,4 y aproximadamente 3,0.

Los tampones preferidos son la citrulina, el ácido malónico o combinaciones de los mismos. Los tampones pueden ser elegidos entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos. Pueden emplearse diversas concentraciones de estos tampones, pero las concentraciones de los tampones están comprendidas, de manera general, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 500 mM.

La citrulina puede encontrarse en forma de L-citrulina, de D-citrulina y de D,L-citrulina y se representa por la estructura A.

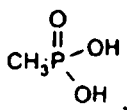


Estructura A

El ácido cianoacético, tal como es empleado en la presente invención, está representado por la estructura C,

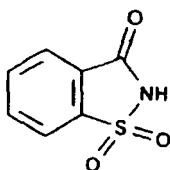


El ácido metilfosfónico, tal como es empleado en la presente invención, está representado por la estructura E



Estructura E

La sacarina, tal como es empleada en la presente invención, está representada por la estructura G



Estructura G

Se supone que la citrulina, que el ácido cianoacético, que el ácido metilfosfónico y que la sacarina pueden obtenerse en el comercio, por ejemplo de una compañía como la Aldrich Chemical Company.

Colorantes

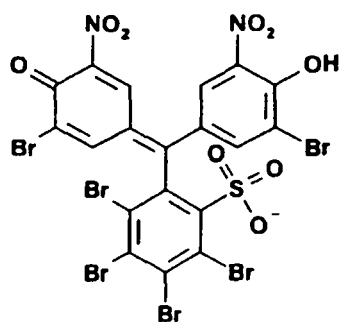
Los colorantes que deben ser empleados en la presente invención tienen valores de pKa que les permiten operar como indicadores de proteína a un pH situado dentro de un rango que se extiende desde aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 3,0. A título de ejemplo, los colorantes pueden tener valores pKa que indiquen una diferencia de color cuando esté presente la proteína en un rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, situado dentro del rango de pH que se extiende desde aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 3,0. El rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, se encuentra, preferentemente, con una aproximación de +/- 0,2 unidades de pH del pH seleccionado, que ha sido predeterminado. De manera adicional, los colorantes pueden tener valores de pKa que no tengan una diferencia de color significativa en ausencia de proteína dentro del rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado. Los colorantes que deben ser usados en la presente invención tienen, de manera preferente, valores de pKa que les permitan operar como indicadores de proteína en un rango de pH que se extienda desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 3,0. Se supone, sin intención de producir una limitación teórica, que tales colorantes, cuando están enlazados con una proteína, están expuestos a un medio circundante diferente que cuando se encuentran libres en solución y desarrollan de manera efectiva un pKa menor para la ionización esencial del cambio de color. Si el colorante, en ausencia de proteína, responde también como indicador de color sensible al pH dentro del rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, entonces la adición de proteínas no será detectada en general, con exactitud.

Los colorantes, que deben ser empleados en la presente invención, proporcionan, en general, una respuesta detectable en presencia de proteína total comprendida entre aproximadamente 2 y aproximadamente 500 mg/dL de proteína. Los colorantes proporcionan, de manera preferente, una respuesta detectable y, en particular, adecuada a la proteína total desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 300 mg/dL de proteína. Se considera que la cantidad de colorante puede variar para dar una respuesta detectable y adecuada fuera de dicho rango preferido.

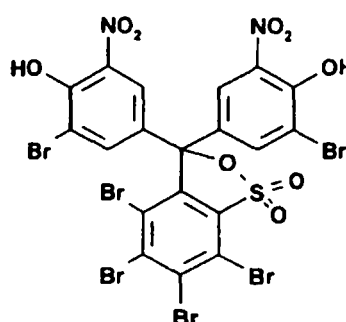
Ejemplos de estos colorantes incluyen las fenolsulfonaftaleínas sustituidas, el rojo de pirogalol o combinaciones de los mismos. Se considera que pueden ser empleados en la presente invención otros colorantes que tiendan a tener una indicación detectable en el espectro de absorción o de fluorescencia del color (que indique transición) en el rango de pH comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3, en ausencia de proteína y una indicación diferente, bajo condiciones idénticas por otra parte, pero en presencia de proteína. El pH para dar una respuesta detectable diferente entre la presencia y la ausencia de proteína debe encontrarse dentro del rango de pH que puede ser mantenido por el tampón cuando se utilice la presente invención.

A título de ejemplo, se considera que pueden ser adecuados en la presente invención colorantes tales como el azul de bromoclorofenol blue (la 3',3"-dibromo-5',5"-diclorofenolsulfonaftaleína); el azul de bromofenol (el azul de tetrabromofenol); la fucsina básica (basic red 9); basic violet 14; el amarillo martius (acid yellow 24); la floxina B (acid red 92); el amarillo de metilo (solvent yellow 2); el rojo congo (direct red 28); el anaranjado de metilo (acid orange 52); y el anaranjado de etilo (el ácido 4-(4-dietilaminofenilazo)benzenosulfónico). Tales colorantes pueden ser empleados en combinación con colorantes tales como la fenolsulfonaftaleína y el rojo de pirogalol.

Los indicadores de fenolsulfonaftaleína particularmente adecuados en la presente invención están representados por las estructuras siguientes, H e I:



Estructura H

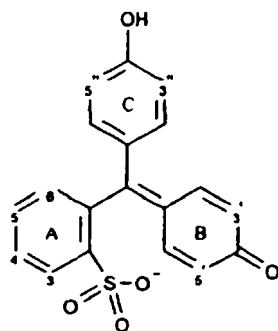


Estructura I

La estructura H representa la estructura del derivado de la fenolsulfonaftaleína en disolventes próticos tales como el agua o un alcohol, mientras que la estructura I representa la forma que predomina en estado seco o en disolventes apróticos tales como los éteres y el acetonitrilo. Los indicadores de "error de proteína" de fenolsulfonaftaleína son indicadores de pH que incluyen un protón ionizable que tiene un valor pKa tal, que el protón no está ionizado a un valor particular de pH a menos que se encuentre en presencia de proteína.

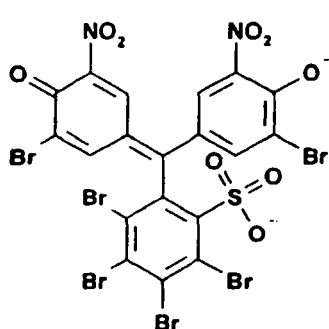
ES 2 305 255 T3

El valor de pKa de un indicador general de fenolsulfonaftaleína muestra la estructura J siguiente, es el valor de pH al cual la mitad del número de moléculas del indicador incluye el grupo desprotonado del hidroxilo fenólico del anillo C. En el caso de los indicadores de error de proteína de fenolsulfonaftaleína, ilustrados precedentemente, se producen dos episodios de desprotonación para provocar un cambio de color observable. La primera desprotonación elimina el protón del ácido arilsulfónico en el anillo A para proporcionar el ión ilustrado más adelante como estructura J.

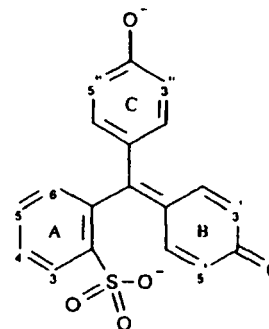


Estructura J

El pKa de este protón es menor que uno, lo que da como resultado la ionización de esta mitad a todos los valores convenientes de pH. Este grupo ionizable es responsable por lo tanto de la solubilidad en agua de estos compuestos. La segunda desprotonación envuelve el desprendimiento de un protón a partir del hidroxilo fenólico del anillo C para proporcionar el dianión como se ha mostrado en las estructuras K y L siguientes.



Estructura K



Estructura L

Con este tipo de indicador de error de proteína, la segunda desprotonación provoca el cambio de color observable que indica la presencia de proteína en la muestra que ha sido ensayada. El indicador de error de proteína de fenolsulfonaftaleína se aplica, de manera típica, a un material de matriz absorbente junto con un tampón para proporcionar un medio ambiente de pH constante, de manera que puede contarse con que el cambio de color es el resultado de la presencia de proteína más que el resultado de un cambio de pH tras el contacto con el fluido de ensayo.

Únicamente aquellos indicadores de error de proteína de fenolsulfonaftaleína que tengan un segundo pKa, que permiten que se produzca la segunda desprotonación, en presencia de proteína, a un pH situado dentro del rango que se extiende desde 2,0 aproximadamente hasta 3,0 aproximadamente son adecuados en la presente invención. Pueden ser adecuados para la invención aquellos indicadores de error de proteína de fenolsulfonaftaleína que tengan un segundo pKa, que permitan la segunda desprotonación, en ausencia de proteína, fuera del pH mantenido. De manera preferente, el segundo pKa, en ausencia de proteína, tiene lugar a un pH que no se encuentra dentro del rango situado entre aproximadamente 2,4 y aproximadamente 3,0 y, de una manera más preferente, a un pH mayor que 3,0. Se considera que una ionización sensible a la presencia de proteína que proporcione por lo tanto una indicación detectable (por ejemplo una respuesta de color) puede ser la primera, la segunda, etc. desprotonación con una distribución diferente de los sustituyentes ionizables.

Muchos indicadores de error de proteína de fenolsulfonaftaleína tienen su segundo pKa en el rango apropiado y, por lo tanto, son adecuados para el empleo en la presente invención. Las fenolsulfonaftaleínas adecuadas incluyen aquellas que están substituidas con grupos captadores de electrones y/o donadores de electrones tales como amino,

empleados con métodos para la detección de proteína basados en el enlace del colorante. Estos dispositivos de análisis o componentes incluyen, de manera típica, un disolvente prótico tal como una mezcla de agua/metanol en el juego de concentraciones dado en la tabla 1. De manera típica, la solución contendrá un agente quelante tal como el ácido fítico y/o el ácido oxálico para inhibir o para prevenir la interferencia procedente de otros componentes en la muestra de ensayo de orina. Los ácidos en el proceso de inmersión de papel pueden estar ajustados a un valor preferido del pH comprendido entre aproximadamente 2,4 y aproximadamente 3, mediante la adición de hidróxido de sodio o similares.

TABLA 1

Componentes opcionales			
Ingrediente	Función	Concentración empleada	Rango general
Agua	Disolvente	95 mL	--
Metanol	Disolvente	5 mL	0-40 mL
Ácido fítico	Quelante	1 g (15 mM)	0-500 mM
Ácido oxálico	Quelante	0.11 g (12 mM)	0-40 mM

Ejemplos

Un ejemplo para la formación de un dispositivo en seco, tal como una tira para diagnóstico, incluye la inmersión de un material tal como papel en una solución acuosa. La tira de diagnóstico puede estar hecha a partir de varios materiales, pero de manera típica está hecha a partir de papel unido a un soporte de plástico. Un ejemplo de un papel adecuado es Ahlstrom 204. Se considera que estas tiras pueden estar hechas a partir de otros materiales tales como un tejido natural o sintético, o un material no tejido.

De conformidad con una realización, se forma una primera solución acuosa mediante la adición de tres submezclas (submezclas 1-3). Para formar la submezcla 1, se añaden conjuntamente 10 ml de metanol, 1,76 ml de TRIS 125 mM ((tris(hidroximetil)aminometano)/metanol) y 44,0 mg de rojo de pirogalol. Estos componentes se mezclaron aproximadamente durante aproximadamente 20 hasta aproximadamente 30 minutos para formar la submezcla 1. Para formar la submezcla 2, se añadieron conjuntamente 4,10 g (3,20 mL) de ácido fítico al 40%, 8,00 mL de PVA acuoso al 5% (alcohol polivinílico) de 31-50 K, 11,2 ml de NaOH 1N y 0,654 mL de molibdato de sodio con 100 mg/mL, y 45,6 mL de agua. Se añadió NaOH para ajustar el pH aproximadamente a 2,3. Estos componentes se mezclaron durante aproximadamente 60 minutos para formar la submezcla 2. Para formar la submezcla 3 se añadieron conjuntamente 217,5 mg de oxalato disódico, 120,0 mL de L-citrulina 500 mM con un pH de 2,5 y 100,0 mg de Cibacron Brilliant Yellow. Los componentes se mezclaron durante aproximadamente 30 minutos para formar la submezcla 3.

Se mezclaron conjuntamente la submezcla 1 y la submezcla 2 aproximadamente durante 10 minutos y a continuación se añadió la submezcla 3. El pH fue de 2,6 y las submezclas combinadas 1-3 se estabilizaron durante 4 horas y se ajustó al volumen. Las submezclas 1-3 formaron una solución de primera inmersión de aproximadamente 200 mL. El papel se sumergió en la solución de primera inmersión y se secó en un horno con tres estadios a 50/50/70°C con 1 flujo de aire de pulgada. El papel usado fue el papel Ahlstrom 204.

A continuación se sumergió el papel en una solución de segunda inmersión de 160 mL. La solución de segunda inmersión se preparó por mezcla de 144 mL de tolueno, 16 mL de THF (estabilizado), 0,48 g de KOK (un carbonato de polipropilenglicol) tal como se ha descrito en la publicación de la patente norteamericana U.S. No. 5,424,215 y 36,57 mg de DNHB (5,5'-dinitro-3',3'',3,4,5,6-hexabromofenolsulfonaftaleína). El papel se secó en un horno con tres estadios a 0°/50°/50°C con un flujo de aire de 1 pulgada para formar la almohadilla activa de la tira para diagnóstico. Las tiras para diagnóstico incluyen la almohadilla activa que está adherida con una tira polímera.

ES 2 305 255 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la determinación de proteína en un líquido de ensayo acuoso, que comprende la combinación del fluido de ensayo con
- 10 (a) un tampón seleccionado entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos, añadiéndose el tampón en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, que incluye el fluido de ensayo, en un rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, situado en el rango que se extiende desde 2,0 hasta 3,0 y
- 15 (b) un colorante que tenga un pKa que le permita operar como un indicador de proteína en el rango de pH, que ha sido predeterminado, y cuya afinidad para con la proteína sea tal, que proporcione una respuesta detectable en presencia de una cantidad mayor que 15 mg/dL de proteína, para hacer que el ensayo sea adecuado, de este modo, para la detección de proteína total en el fluido de ensayo.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón se selecciona entre el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón se añade en una cantidad suficiente como para mantener el pH de dicho análisis, con inclusión del fluido de ensayo, dentro de un rango que se extiende desde 2,4 hasta 3,0.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, el rojo de pirogalol o combinaciones de los mismos.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, estando octa-sustituida la fenolsulfonaftaleína sustituida por amino, amida, aromático, alquilo, hidroxilo, tio, carboxílico, alcoxi, cetoxi, acetilo, halógeno, nitro, ciano o combinaciones de los mismos.
- 30 6. El método de la reivindicación 4, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, estando sustituida la fenolsulfonaftaleína sustituida en las posiciones 5', 5'' por nitro y en las posiciones 3', 3'', 3, 4, 5 y 6 por cloro, por bromo o por yodo.
- 35 7. El método de la reivindicación 4, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, siendo la fenolsulfonaftaleína sustituida la 5,5''-dinitro-3',3'',3,4,5,6-hexabromofenolsulfonaftaleína o la 5'-nitro-5''-yodo-3',3'',3,4,5,6-hexabromofenolsulfonaftaleína.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en el que el colorante es el rojo de pirogalol e incluye, además, la combinación del fluido de ensayo con una sal de molibdato o de tungstato.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón y el colorante están absorbidos en la tira de ensayo de material absorbente.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en el que la respuesta detectable proporciona una buena resolución a concentraciones de proteína comprendidas entre 15 y 300 mg/dL.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el colorante actúa como indicador de color en presencia de proteína a un pH situado dentro del rango comprendido entre 2,0 y 3,0.
- 50 12. El método de la reivindicación 11, en el que el colorante opera como indicador de color en presencia de proteína a un pH situado dentro del rango comprendido entre 2,4 y 3,0.
13. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón mantiene el pH del análisis con inclusión del fluido de ensayo a un pH, que ha sido predeterminado, más o menos aproximadamente 0,2 unidades de pH.
- 55 14. El método de la reivindicación 1, que comprende la combinación del fluido de ensayo con
- 60 (a) un tampón seleccionado entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos, añadiéndose el tampón en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, con inclusión del fluido de ensayo, dentro de +/- 0,2 unidades de pH de un rango de pH seleccionado, situado en un rango que se extiende desde 2,0 hasta 3,0 y
- 65 (b) un colorante que tenga un pKa que le permita operar como indicador de color en presencia de proteína en el rango de pH, que ha sido predeterminado, y cuya afinidad para la proteína sea tal, que proporcione una respuesta detectable en presencia de una cantidad de proteína mayor que 15 hasta 500 mg/dL para que, de este modo, el análisis sea adecuado para la detección de proteína total en el fluido de ensayo.

ES 2 305 255 T3

15. Un dispositivo seco para uso en la determinación de niveles de proteína en una muestra de ensayo líquida, que comprende un material absorbente, que tiene absorbido en el mismo

5 (a) un tampón seleccionado entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos, añadiéndose el tampón en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, que incluye el fluido de ensayo, en un rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, situado en el rango que se extiende desde 2,0 y hasta 3,0 y

10 (b) un colorante que tenga un pKa que le permita operar como un indicador de proteína en el rango de pH, que ha sido predeterminado, y cuya afinidad para con la proteína sea tal, que proporcione una respuesta detectable en presencia de una cantidad mayor que 15 mg/dL de proteína, tras contacto entre el dispositivo y la muestra de ensayo líquida para que, de este modo, el dispositivo sea adecuado para la detección de proteína total en la muestra de ensayo líquida.

15 16. El dispositivo seco de la reivindicación 15, en el que el tampón se elige entre el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos.

20 17. El dispositivo seco de la reivindicación 15, en el que el tampón se añade en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, con inclusión del fluido de ensayo, dentro de un rango que se extiende entre 2,4 y 3,0.

18. El dispositivo seco de la reivindicación 15, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, el rojo de pirogalol o combinaciones de los mismos.

25 19. El dispositivo seco de la reivindicación 18, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, estando octasustituida la fenolsulfonaftaleína sustituida por amino, amida, aromático, alquilo, hidroxilo, tio, carboxílico, alcoxi, cetoxi, acetilo, halógeno, nitro, ciano o combinaciones de los mismos.

30 20. El dispositivo seco de la reivindicación 18, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, estando sustituida la fenolsulfonaftaleína sustituida en las posiciones 5', 5'' por nitro y en las posiciones 3', 3'', 3, 4, 5 y 6 por cloro, bromo o yodo.

35 21. El dispositivo seco de la reivindicación 18, en el que el colorante es una fenolsulfonaftaleína sustituida, siendo la fenolsulfonaftaleína sustituida la 5,5''-dinitro-3',3'',3,4,5,6-hexabromofenolsulfonaftaleína o la 5'-nitro-5''-yodo-3',3'',3,4,5,6-hexabromofenolsulfonaftaleína.

40 22. El dispositivo seco de la reivindicación 15, en el que el colorante es el rojo pirogalol e incluye, además, la combinación del fluido de ensayo con una sal de molibdato o de tungstato.

23. El dispositivo seco de la reivindicación 15, en el que la respuesta detectable proporciona una buena resolución a concentraciones de proteína comprendidas entre 15 y 300 mg/dL.

45 24. El dispositivo seco de la reivindicación 15, en el que el colorante opera como indicador de color en presencia de proteína a un pH comprendido dentro del rango que se extiende entre 2,0 y 3,0.

25. El dispositivo seco de la reivindicación 24, en el que el colorante opera como indicador de color en presencia de proteína a un pH situado dentro del rango que se extiende entre 2,4 y 3,0.

50 26. El dispositivo seco de la reivindicación 15, en el que el tampón mantiene el pH del análisis con inclusión del fluido de ensayo a un pH, que ha sido predeterminado, más o menos aproximadamente 0,2 unidades de pH.

27. El dispositivo seco de la reivindicación 15, que comprende un material absorbente que contiene absorbido en el mismo

55 (a) un tampón seleccionado entre la citrulina, el ácido cianoacético, el ácido metilfosfónico, la sacarina o combinaciones de los mismos, añadiéndose el tampón en una cantidad suficiente como para mantener el pH del análisis, con inclusión del fluido de ensayo, dentro de +/- 0,2 unidades de pH de un rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, situado en un rango que se extiende desde 2,0 hasta 3,0 y

60 (b) un colorante que tenga un pKa que le permita operar como indicador de color en presencia de proteína en el rango seleccionado de pH, que ha sido predeterminado, y cuya afinidad para la proteína sea tal, que proporcione una respuesta detectable en presencia de 15 hasta 500 mg/dL tras contacto entre el dispositivo y la muestra de ensayo líquida de manera que haga que el dispositivo sea adecuado para la detección de proteína total en la muestra de ensayo líquida.

65