

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 925**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05777646 .0**
- 96 Fecha de presentación: **08.07.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1789793**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **ENSAYO DE COMBINACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ALCOHOL Y DROGAS DE ADICCIÓN.**

30 Prioridad:
09.07.2004 US 888029

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2012

73 Titular/es:
**BRANAN MEDICAL CORP.
SUITE E & F, 10015 MUIRLANDS ROAD
IRVINE, CA 92618, US**

72 Inventor/es:
**WONG, Raphael y
ZOLTEK, Richard**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 925 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

Ensayo de combinación para la detección de alcohol y drogas de adicción

Campo de la invención

5 La presente invención versa acerca de un aparato y un procedimiento para recoger fluidos corporales y proporcionar un ensayo de uno o más analitos presentes en esos fluidos corporales.

Antecedentes de la invención

10 Las drogas de adicción y el alcohol son las causas más frecuentes de la conducción en estado de intoxicación, además de muchos otros problemas relacionados con su uso. Por ejemplo, el uso ilegal de drogas y el uso excesivo de alcohol concurren en muchos accidentes, lesiones y afecciones médicas. Examinar individuos para detectar drogas de adicción y alcohol es un importante procedimiento en la identificación de aquellos que pueden causarse lesiones a sí mismos y a otros. El examen también puede proporcionar un beneficio adicional como un elemento disuasorio contra un uso inapropiado y/o ilegal de drogas o alcohol. Con ese fin, se han desarrollado muchas pruebas para examinar individuos para detectar la presencia de drogas de adicción y alcohol, o metabolitos o otros residuos de los mismos. Por ejemplo, algunos de tales aparatos y procedimientos implican la determinación de la presencia y/o de la cantidad de drogas de adicción o alcohol en fluidos biológicos, como sangre, orina y fluido oral. Se ha demostrado que estos son procedimientos analíticos útiles.

15 Sin embargo, los procedimientos químicos preferidos de tales pruebas han incluido a menudo complejos procedimientos de laboratorio, como la cromatografía de gases para el análisis de sangre u orina, y una gama de pruebas de laboratorio o *in situ*. Estas pruebas implican procedimientos que llevan mucho tiempo y, por ello, no son útiles para una determinación rápida de la intoxicación de un individuo, como la que podría precisarse durante una detención de un automóvil en el arcén.

20 Así, hay una demanda creciente de un procedimiento simple, preciso y reproducible para determinar la presencia de drogas de adicción o alcohol en fluidos corporales. Tal prueba no solo llevaría a determinaciones más rápidas de intoxicación o sobriedad durante detenciones de automóviles, sino que también podría ser usada en otros campos, como garantizar que los operadores de maquinaria peligrosa, como equipo pesado de construcción o material militar, no estén intoxicados. Además, hay el beneficio añadido de que la rápida identificación de tales individuos contribuye a apartar a esos individuos del manejo de automóviles y de otra maquinaria, reduciendo con ello costes, tanto en términos humanos (es decir, lesiones, vidas perdidas, etc.) como en términos económicos.

25 Para proporcionar un análisis más rápido, se han desarrollado varios dispositivos de prueba que usan tiras reactivas de prueba. En general, se aplica a la tira reactiva una muestra de fluidos corporales, como orina, sangre o fluido oral, para efectuar una reacción, tal como una reacción inmunológica o enzimática, para determinar la presencia de los analitos objeto de prueba. Por ejemplo, una tira reactiva tal para drogas de adicción presentes en sustancias como sangre, orina, suero y tejido, usa principios inmunológicos. En particular, se han usado anticuerpos y antígenos específicos a drogas en una variedad de procedimientos de inmunoensayo para detectar anticuerpos o antígenos en fluidos corporales de seres humanos y animales. Los dispositivos de prueba conocidos pueden identificar la presencia o la ausencia de drogas de adicción, como la cocaína, los opiáceos y la marihuana, usando los conjugados proteínicos de estos derivados de drogas y sus anticuerpos acompañantes.

30 Además de las tiras reactivas de inmunoensayo descritas en lo que antecede, otras tiras reactivas usan reacciones enzimáticas para determinar la presencia de alcohol en fluidos corporales. Tales dispositivos son útiles debido al uso generalizado de las pruebas de detección de alcohol en la sociedad de hoy. Por ejemplo, aproximadamente una tercera parte de todos los pacientes actualmente admitidos a urgencias hospitalarias son sometidos a pruebas para detectar niveles de alcohol en sangre con el fin de realizar un juicio acertado en cuanto a la naturaleza de la condición clínica del paciente. Antes de la aparición de tales tiras reactivas, las mediciones se determinaban tomando muestras de sangre por medio de punciones en vena y llevando a mano la muestra a un laboratorio para una determinación de alcohol en sangre. El procedimiento previo duraba de treinta minutos a algunas horas.

35 Sin embargo, las pruebas más nuevas han incluido tiras reactivas que emplean la enzima alcohol-oxidasa. La alcohol-oxidasa es una enzima particularmente inestable que experimenta un deterioro y una pérdida de actividad rápidos. En particular, la alcohol-oxidase reacciona con el alcohol para formar un peróxido de hidrógeno. Se puede hacer entonces que el peróxido de hidrógeno reaccione con un cromógeno u otro marcador detectable para producir la apariencia de un color particular en una tira reactiva que signifique la presencia de alcohol en el cuerpo.

40 La mayoría de las pruebas *in situ* de drogas de adicción se basan en un inmunoensayo de flujo lateral, que es un ensayo dinámico con un tamaño indefinido de muestra. El ensayo enzimático del alcohol es un ensayo de punto final con un volumen definido de muestra. Por naturaleza, estos dos tipos de pruebas requieren diferentes aplicaciones de muestras y diferentes interpretaciones de los resultados. Ejemplos comercialmente disponibles de pruebas de drogas de adicción y alcohol son: Prueba Oratect™ de Fluido Oral para el Control de Drogas Múltiples COC/MET/THC/AMP/OPL/PCP (Branan Medical Corporation, Irvine, California) y Alco-Screen (Chemetics, North

Webster, Indiana), respectivamente. Además, la patente estadounidense nº 6.248.598 da a conocer un inmunoensayo que permite tanto la recogida de fluido oral como un ensayo de fluido oral para la detección de uno o más analitos con una lectura visual. La patente 6.248.598 da a conocer un dispositivo que recoge fluido oral e inicia un ensayo o ensayos en el fluido oral, pero no da a conocer un dispositivo que pueda evaluar mediante ensayo la presencia tanto de drogas de adicción como de alcohol.

Así, con el actual aparato de prueba subsisten algunas deficiencias. Por ejemplo, aunque se han desarrollado diversas pruebas para detección tanto de drogas de adicción como de alcohol, las pruebas de detección de drogas de adicción operan sobre principios inmunológicos, mientras que las pruebas de detección de alcohol operan por medio de reacciones enzimáticas. En general, es difícil combinar estos dos tipos de pruebas en un solo dispositivo. Por ejemplo, los dispositivos que usan diversas tiras reactivas (u otras membranas) para alojar componentes de pruebas tanto de drogas de adicción como de alcohol, experimentan la desventaja de que los reactivos para las diferentes pruebas tengan reacciones cruzadas entre sí. Por ejemplo, los reactivos de la prueba de detección de alcohol usados para efectuar un cambio de color pueden migrar a la tira de inmunoensayo para interferir en la prueba de detección de drogas de adicción. Como consecuencia de dificultades como las descritas en lo que antecede, en la actualidad deben usarse dispositivos separados cuando se comprueba la presencia de drogas de adicción y alcohol. Esta necesidad de tiras reactivas separadas incrementa la cantidad de aparatos que debe mantenerse a mano para llevar a cabo tales pruebas, así como aumentar el tiempo que lleva administrar múltiples pruebas diferentes. Los costos de tener a mano varios dispositivos de prueba diferentes también aumentan. Además, cualquier procedimiento de prueba que use muestras de sangre y/u orina también puede ser invasivo para el individuo sometido a prueba.

En vista de lo anterior, son deseables ensayos y procedimientos adicionales.

Resumen de la invención

La presente invención supera las deficiencias descritas en lo que antecede de aparatos y procedimientos de prueba proporcionando un aparato de prueba que permite comprobar la presencia tanto de drogas de adicción como de alcohol dentro de un solo dispositivo. En general, el aparato de la presente invención incluye un inmunoensayo para detectar cualitativamente la presencia de diversas drogas de adicción y una almohadilla reactiva que incluye una enzima como prueba para la detección de alcohol. Los dos tipos de pruebas están contenidos dentro del mismo alojamiento y estas pruebas se llevan a cabo usando la misma fuente de muestras de un sujeto que está siendo sometido a pruebas.

En particular, la presente invención proporciona un aparato para la prueba de múltiples analitos que incluye un alojamiento que contiene una almohadilla de recogida de muestras que se extiende parcialmente desde el alojamiento. La almohadilla de recogida está en contacto de acción capilar con un único material de refuerzo que soporta (ya sea directa o indirectamente): (1) una primera tira reactiva que tiene componentes que comprenden una almohadilla de muestras y una almohadilla de absorción en comunicación de acción capilar para un inmunoensayo, estando dicha almohadilla de muestras y dicha almohadilla de absorción están cada una en comunicación de acción capilar con dicha primera tira reactiva, y (2) una segunda tira reactiva que tiene componentes para una reacción enzimática. En uso, la muestra en la almohadilla de recogida hace contacto con las tiras reactivas primera y segunda para la detección tanto inmunológica como enzimática de un analito o analitos contenidos en la muestra, estando cada una de las tiras reactivas primera y segunda asociadas con la almohadilla de recogida, pero no están asociadas entre sí. Así, una vez que se deposita una muestra sobre la almohadilla de recogida, fluye a las tiras reactivas primera y segunda para desencadenar las pruebas tanto inmunológica como enzimática.

La presente invención también proporciona un procedimiento para comprobar la presencia tanto de drogas de adicción como de alcohol proporcionando un aparato según se ha descrito en lo que antecede, iniciando un inmunoensayo y una reacción enzimática, y detectando los resultados del inmunoensayo y la reacción enzimática. En general el inicio del inmunoensayo y de la reacción enzimática incluye suministrar una muestra a la almohadilla de recogida. Después se espera una cantidad de tiempo predeterminada para que la muestra se traslade por acción capilar a las tiras reactivas primera y segunda y después de obtienen los resultados de control y de la prueba visualmente en las tiras reactivas mediante un dispositivo de lectura automatizada, etc.

El aparato y el procedimiento de prueba de la presente invención pueden usar fluido oral como muestra. Dado que se usa fluido oral en vez de sangre, orina u otro fluido corporal como muestra de prueba, el aparato evita los problemas descritos en lo que antecede de intrusión en la privacidad, invasividad de la persona y también puede evitar el problema de alteración de las muestras. Es decir, dado que el sujeto puede ser observado mientras se administra la prueba, se elimina la oportunidad de que el sujeto use una muestra fantasma ajena, o de que altere su propia muestra. Además, debido a su tamaño, su naturaleza simple y rápida, etc., las tiras reactivas pueden ser usadas en lugares de trabajo, en colegios y pueden ser hechas a medida para una rápida verificación del uso ilegal de materiales controlados o de otras sustancias.

El carácter físico-químico del dispositivo de la presente invención evalúa mediante ensayo la presencia de ambos tipos de analito dentro de un solo alojamiento de prueba. Aunque los ensayos se realizan a la vez usando la misma

muestra, las lecturas pueden no aparecer necesariamente a la vez, aunque será beneficioso que las lecturas aparezcan en el tiempo cerca entre sí.

Más específicamente, el aparato de la presente invención incluye un alojamiento que tiene una almohadilla de recogida para la recogida de fluido oral. La almohadilla de recogida incluye además un material absorbente que, cuando se coloca en la boca de un sujeto, permite la absorción de fluido oral en la almohadilla de recogida. El fluido oral fluye por toda la almohadilla de recogida gracias a la acción de efecto mecha (es decir, la acción capilar) hasta una primera tira reactiva y una segunda tira reactiva. El uso de tiras reactivas separadas evita que los reactivos de la prueba de presencia de alcohol tengan una reacción cruzada con la prueba de presencia de drogas de adicción y viceversa. Esto se debe a que los reactivos para cada una de las pruebas no están alojados en la misma tira o membrana. Aunque las tiras reactivas primera y segunda están asociadas cada una con la almohadilla de recogida, no están asociadas entre sí. Se usa una tira reactiva para comprobar la presencia de drogas de adicción y se usa la otra tira reactiva para comprobar la presencia de alcohol. Las designaciones de "primera" y "segunda" se usan solo por conveniencia y no es preciso que indiquen ningún orden de reacción. Cualquiera de las dos tiras puede ser designada "primera" o "segunda".

El aparato incluye, además, reactivos de prueba en cada una de las tiras reactivas primera y segunda, que se usan para detectar la presencia de cualquier analito de droga que se esté buscando o de alcohol. Más específicamente, la primera tira reactiva tiene componentes o reactivos que incluyen un marcador detectable específicamente adaptado para enlazarse con un analito de droga que ha de ser detectado. El marcador está adaptado para enlazarse con el analito estando conjugado a un anticuerpo al analito de la droga objeto de prueba. El marcador no está inmovilizado ni unido de otra forma a la primera tira reactiva, y se mueve por toda la primera tira reactiva con el flujo del fluido oral de la muestra. La primera tira reactiva incluye, además, un analito de droga inmovilizado en una región de prueba en la tira reactiva. Este analito de droga corresponde a la droga objeto de prueba en la muestra. El marcador está situado en la primera tira reactiva entre el punto en el que la almohadilla de recogida recibe la muestra y el analito inmovilizado de la droga. Si la muestra de fluido oral incluye una cualquiera de las drogas para las que hay presentes un anticuerpo y un analito, la o las drogas están ligadas por el anticuerpo presente en la almohadilla de conjugados. Así, el correspondiente anticuerpo no está disponible para enlazar el analito en la región de prueba [detectable por el ensayo cuando fluye frente a la región de prueba]. Este es un resultado positivo. Si no hay analito de droga en la muestra, entonces el anticuerpo presente en la almohadilla de conjugados estará libre para enlazarse al analito de droga en la región de prueba. El conjugado del analito de anticuerpo en la región de prueba creará una señal detectable, debido al marcador detectable, indicado una prueba que es negativa para la presencia del analito de droga.

La segunda tira reactiva incluye reactivos enzimáticos específicamente adaptados para efectuar un cambio de color de una porción particular de la tira reactiva, la almohadilla reactiva, cuando hay presente alcohol en la muestra de fluido oral. En general, la prueba enzimática de presencia de alcohol incluye una almohadilla enzimática que incluye alcohol-oxidasa y peroxidasa. Esta almohadilla enzimática está en comunicación con una membrana de efecto capilar que, a su vez, está conectada operativamente con la almohadilla de recogida. En una realización, la almohadilla reactiva, al contacto con soluciones de alcohol, se volverá rápidamente de diferentes colores de matices de verde a azul, dependiendo de la cantidad de alcohol presente.

En otra realización, la presente invención también proporciona un procedimiento para la detección de analitos en el fluido oral de un sujeto. El procedimiento incluye proporcionar un aparato generalmente tal como se describe en lo que antecede, recoger fluido oral en la primera porción del aparato y detectar cualquier analito presente en el fluido oral observando cualquier marcador detectable en la primera tira reactiva y cualquier cambio de color en la segunda tira reactiva.

El objeto de la invención es también un procedimiento de preparación de un aparato para comprobar la presencia de drogas de adicción y alcohol en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar un alojamiento que contiene una almohadilla de recogida de muestras que se extiende parcialmente desde dicho alojamiento; y

proporcionar un único material de refuerzo que soporta unas tiras reactivas primera y segunda, teniendo dicha primera tira reactiva componentes que comprenden una almohadilla de muestras y una almohadilla de absorción en comunicación de acción capilar para un inmunoensayo, estando dicha primera tira reactiva en comunicación de acción capilar con dicha almohadilla de recogida, estando dicha almohadilla de muestras y dicha almohadilla de absorción en comunicación de acción capilar con dicha primera tira reactiva; y una segunda tira reactiva que tiene componentes para una reacción enzimática, estando dicha segunda tira reactiva en comunicación de acción capilar con dicha almohadilla de recogida, estando asociada cada una de las tiras reactivas primera y segunda con la almohadilla de recogida, pero asociadas entre sí.

En una realización preferente, dicha primera tira comprende, además, una almohadilla de conjugados y una membrana de prueba, y el procedimiento comprende, además, depositar un primer trazador en dicha almohadilla de conjugados de tal manera que sea libremente amovible con respecto a la misma en presencia de un fluido.

En una realización preferente adicional, el procedimiento comprende, además, depositar un trazador de control en dicha almohadilla de conjugados de tal manera que sea libremente amovible con respecto a la misma en presencia de un fluido.

5 En una realización preferente, el procedimiento comprende, además, inmovilizar una pluralidad de analitos en dicha membrana de prueba.

En una realización preferente del procedimiento, dicha segunda tira reactiva comprende, además, una tira de acción capilar y una almohadilla de reacción y, además, comprende la deposición de una pluralidad de reactivos para una reacción enzimática en dicha almohadilla de reacción.

10 Estas y otras ventajas de la presente invención serán evidentes en vista de las siguientes figuras y de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva de un aparato de la presente invención que muestra una superficie superior del aparato adaptado para comprobar la presencia de drogas de adicción;

15 la FIG. 2 es una vista en perspectiva del aparato de la presente invención que muestra una superficie inferior del mismo aparato adaptado para comprobar la presencia de alcohol;

la FIG. 3A es una vista lateral de componentes del interior del aparato de la presente invención que muestra componentes de las tiras reactivas primera y segunda para la detección de drogas de adicción y de alcohol;

20 la FIG. 3B es una vista lateral de componentes del interior de una realización alternativa del aparato de la presente invención que muestra componentes de las tiras reactivas primera y segunda para la detección de drogas de adicción y de alcohol;

la FIG. 4 es un esquema de una prueba de una realización de la presente invención que representa una muestra añadida a la almohadilla de recogida, conjugados marcador-anticuerpo en la almohadilla de conjugados, analitos de droga ligados a una región de prueba, un analito de control ligado a una región de control, y una almohadilla absorbente;

25 la FIG. 5 es un esquema de la prueba de la FIG. 4 que representa analitos de droga en la muestra que fluyen a la almohadilla de conjugados y que se enlazan con los conjugados marcador-anticuerpo; y

la FIG. 6 es un esquema de la prueba de la FIG. 4, después de que el flujo de la muestra haya avanzado hasta la almohadilla absorbente, que representa el enlace de algunos conjugados marcador-anticuerpo en la región de prueba, y el enlace del conjugado de control en la región de control.

30 Las Figuras 4-6 no están dibujadas a la escala correspondiente de las Figuras 1-3.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen parte de la memoria, ilustran realizaciones de la invención y, junto con una descripción general de la invención dada en lo que antecede, y de la descripción detallada de las realizaciones dada en lo que sigue, sirven para explicar los principios de la invención.

Descripción detallada

35 Se presentan un aparato y un procedimiento de prueba por los que se proporcionan tiras reactivas para la detección de drogas de adicción y alcohol en un solo aparato de prueba. Tal aparato y tal procedimiento reducen los aparatos, el costo y la duración de tiempo de la prueba. También proporciona una prueba que minimiza la invasividad experimentada por el sujeto sometido a la prueba.

40 Con referencia ahora a las Figuras, la invención está dirigida a un aparato 10 que permite la detección de la presencia tanto de alcohol como de drogas distintas del alcohol, denominadas convencionalmente drogas de adicción, tal como se describirá ulteriormente, dentro de un único aparato. En general, el aparato 10 de la presente invención incluye una primera tira reactiva 12 o más, denominadas colectivamente "primera tira reactiva", aunque el aparato no está limitado a una sola tira. El aparato 10 incluye, además, una segunda tira reactiva 14 para el alcohol. Más en particular, la primera tira reactiva 12 puede incluir un inmunoensayo para detectar la presencia de diversas drogas de adicción y la segunda tira reactiva 14 puede incluir una almohadilla reactiva que incluye al menos una enzima reactiva con el alcohol. La presente invención modifica el carácter tanto físico como químico de estas pruebas para lograr la meta de someter a ensayo ambos tipos de analitos dentro de un solo dispositivo de prueba.

45 Aunque puede usarse un aparato combinado 10 de prueba, según se describe en el presente documento, con muchos tipos diferentes de muestras 16, como sangre, orina, etc., en una realización particular, se usa como muestra 16 fluido oral. Dado que se usa fluido oral en lugar de sangre, orina u otro fluido corporal como muestra 16 de prueba, el aparato 10 evita los problemas descritos en lo que antecede de intrusión en la privacidad, invasividad

de la persona y también puede evitar el problema de alteración de las muestras. Además, debido a su naturaleza simple y rápida, las tiras reactivas 12, 14 pueden ser usadas en lugares de trabajo, en colegios y pueden ser hechas a medida para una rápida verificación del uso ilegal de materiales controlados.

Más específicamente, y con referencia a las Figuras 1-3, el aparato 10 de la presente invención incluye un alojamiento 18 para contener componentes del dispositivo de prueba que incluyen reactivos y material para un ensayo para detectar drogas de adicción, reactivos y material para un ensayo para detectar alcohol e incluye una almohadilla 20 de recogida para la recogida de fluido oral. Según se usa en el presente documento, la expresión “drogas de adicción” excluye el alcohol, pero incluye todas las drogas de adicción, dado que se proporciona una prueba separada de detección de alcohol con el mismo dispositivo. En la realización ilustrada, la almohadilla 20 de recogida se extiende desde el alojamiento 18, de tal forma que esta porción puede ser insertada fácilmente en la boca. La almohadilla 20 de recogida incluye un material absorbente que, cuando se coloca en la boca de un sujeto, absorbe fluido oral. El fluido oral fluye por toda la almohadilla 20 de recogida gracias a la acción de acción capilar, haciendo contacto con la almohadilla de muestras de la primera tira reactiva 12 de detección de la droga de adicción y la almohadilla de acción capilar de la segunda tira reactiva 14 de detección de alcohol. En la realización ilustrada, un único material 15 de refuerzo está asociado con la primera tira reactiva 12. Este refuerzo 15 soporta así la primera tira reactiva 12. También proporciona soporte indirecto (en la realización ilustrada) para la segunda tira reactiva 14. Aunque las tiras reactivas primera y segunda 12, 14 están asociadas con la almohadilla 20 de recogida, no están asociadas entre sí en la realización ilustrada. La primera tira reactiva 12 se usa para detectar drogas de adicción y la segunda tira reactiva 14 se usa para detectar la presencia de alcohol. Como puede verse en las Figuras, en la realización ilustrada, tanto la primera tira reactiva 12 como la segunda tira reactiva 14 están dispuestas dentro del alojamiento 18.

Con referencia más en particular a la Fig. 3A, la primera tira reactiva 12 (para drogas de adicción) del aparato 10 de la presente invención incluye al menos una almohadilla 22 de conjugados asociada con una membrana 24 de prueba. Esta primera tira reactiva 12 inicia al menos un inmunoensayo que proporciona un resultado visual cualitativo que indique la presencia de una o más drogas y/o de metabolitos de drogas (denominados “analitos”) en la muestra. En una realización, la membrana 24 de prueba incluye una región 26 de prueba, que incluye una o más zonas 54 de reacción y una región 28 de control. La región 26 de prueba incluye dos conjugados de analitos de droga y proteína (representados ambos por el número de referencia 30) para drogas de adicción particulares objeto de prueba. Estos conjugados 30 de analitos y proteínas son inmovilizados sobre la membrana 24 en la región 26 de prueba. La región 28 de control incluye un analito 32 de control inmovilizado en la membrana 24. En una realización de control, este analito 32 de control es un anticuerpo cabra antirratón recubierta sobre la membrana 24 o unida a ella de otra manera en la región 28 de control. La almohadilla 22 de conjugados incluye conjugados marcador-anticuerpo 34 dispuestos sobre la misma de tal manera que sean libremente amovibles con respecto a la misma. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “conjugado marcador-anticuerpo” se refiere a un anticuerpo móvil marcado antianalitos. El aparato 10 de la presente invención incluye, además, una almohadilla 40 de muestras y una almohadilla 42 de absorción asociada con la primera tira reactiva 12. La primera tira reactiva 12 tiene componentes que comprenden una almohadilla 40 de muestras y una almohadilla 42 de absorción, estando dicha almohadilla 40 de muestras y dicha almohadilla 42 de absorción en comunicación de acción capilar. En la realización ilustrada, puede verse que la almohadilla 40 de muestras está en contacto tanto con la almohadilla 20 de recogida como con la almohadilla 22 de conjugados. La almohadilla 42 de absorción está situada en el extremo del aparato 10 en la dirección del flujo de la muestra y está asociada con la membrana 24 de la primera tira reactiva 12.

La segunda tira reactiva 14 del aparato 10 de la presente invención, en la realización ilustrado, incluye una tira 44 de acción capilar en asociación de acción capilar con una almohadilla 46 de reacción. La tira 44 de acción capilar en la realización ilustrada está asociada con la almohadilla 20 de recogida. En consecuencia, el aparato 10 de prueba de la presente invención incluye caras primera y segunda 48, 50, incluyendo cada una de las caras primera y segunda 48, 50 al menos una ventana 52 para obtener resultados de las pruebas del aparato 10. Como puede verse en la Fig. 1, la realización ilustrada incluye dos ventanas 52 dispuestas sobre las regiones 26, 28 de prueba y de control de la membrana 24 de la primera tira reactiva 12 y, con referencia a la Fig. 2, la segunda cara 50 del aparato 10 incluye una ventana 52 dispuesta sobre la almohadilla 46 de reacción de la segunda tira reactiva 14.

Según se describe en lo que antecede, el aparato 10 incluye, además, reactivos de prueba en cada una de las tiras reactivas primera y segunda 12, 14, que se usan para detectar la presencia de cualquier analito de droga que se esté buscando o de alcohol. Más específicamente, la almohadilla 2 de conjugados incluye conjugados marcador-anticuerpo adaptados para enlazarse al analito a través de un anticuerpo 38 específico del analito. La primera tira reactiva 12 incluye, además, al menos un primer conjugado 30 de analito de droga y proteína ligado a una región 26 de prueba en la primera tira reactiva 12. Si la muestra 16 incluye analitos de droga, los analitos estarán ligados por el conjugado marcador-anticuerpo 34 y, así, el conjugado marcador-anticuerpo 34 no se enlazará con el conjugado 30 de analito de droga y proteína inmovilizado en la región 26 de prueba. Si no hay ningún analito de droga en la muestra 16, entonces el conjugado marcador-anticuerpo se enlazará con el conjugado 30 del analito de droga y proteína inmovilizado en la región 26 de prueba. El conjugado marcador-anticuerpo 34 ligado al conjugado de analito de droga y proteína en la región 26 de prueba creará una señal detectable, indicando una prueba negativa. Esta prueba se describirá con mayor detalle más adelante. Aunque en el aparato 10 de la presente invención se usa un inmunoensayo competitivo que incluye un marcador que señala una prueba negativa, los expertos en la técnica

reconocerán que la invención no está limitada a este tipo de prueba, ya que pueden usarse otros tipos de prueba. La invención tampoco está limitada a la prueba particular de detección de alcohol descrita en el presente documento, como reconocerán los expertos en la técnica.

5 La membrana 24 puede estar fabricada de nitrocelulosa o nailon activado. Los reactivos del inmunoensayo son secados e inmovilizados sobre la membrana 24. En la realización ilustrada, la primera tira reactiva 12 contiene componentes para el inmunoensayo, estando los reactivos reformulados depositados en múltiples zonas 54 de reacción separadas dentro de la región 26 de prueba de la membrana 24, una zona 54 de reacción para cada droga de adicción objeto de prueba. Por ejemplo, el aparato 10 de la presente invención puede incluir zonas 54 de reacción, incluyendo cada zona 54 de reacción un tipo de conjugado inmovilizado 30 de analito de droga y proteína.
10 Estos conjugados 30 de analitos de droga y proteína pueden escogerse de cocaína, d-metanfetamina, 11-nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol, d-anfetamina, opiáceos y fenciclidina, etc. Los expertos en la técnica reconocerán que estos conjugados 30 de analitos de droga y proteína son meramente ejemplares y que puede inmovilizarse un analito de cualquier sustancia que se desee detectar en una zona 54 de reacción particular.

15 En cuanto al ensayo de detección de drogas de adicción, la farmacocinética de la cocaína, los opiáceos, la anfetamina, la metanfetamina, la fenciclidina y los cannabinoides muestra que estas drogas son detectables en los fluidos corporales, como el fluido oral. El alcohol también es detectable en el fluido oral. El aparato 10 de la presente invención integra la recogida de fluido oral y una prueba de análisis por inmunoensayo de flujo lateral para la detección de drogas de adicción y un ensayo enzimático para la detección de etanol en un solo dispositivo integrado.

20 La prueba de detección de drogas de adicción puede estar basada en un procedimiento de inmunoensayo competitivo en el cual los conjugados 30 de analitos de drogas y proteína inmovilizados en la membrana 24 de la primera tira reactiva 12 compiten con la droga o los analitos que puedan estar presentes en el fluido oral, para sitios limitados 38 de enlace con anticuerpos en el conjugado marcador-anticuerpo 34. En una realización particular, el marcador detectable 36 es oro coloidal. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que puede usarse cualquier otro marcador detectable 36, incluye los detectables visualmente a simple vista, los dotados de fluorescencia y otros procedimientos no visuales de detección. Durante la prueba, se recoge fluido oral en la almohadilla 20 de recogida y migra a lo largo del recorrido del flujo de la membrana 24. Si no hay presente ninguna droga en el fluido oral, el conjugado marcador-anticuerpo 34 se enlazará con los conjugados 30 de analitos de droga y proteína en la membrana 24 formando bandas en zonas específicas 54 de reacción en la región 26 de prueba. Cuando se usa oro coloidal como marcador, esas bandas son visibles. Por lo tanto, la presencia de una banda coloreada en una zona específica 54 de reacción indica un resultado negativo para esa droga específica. Si hay presentes cualquier droga o drogas en el fluido oral, compiten con los conjugados inmovilizados 30 de analitos de drogas y proteína para sitios limitados de enlace con anticuerpos del conjugado marcador-anticuerpo 34. Cuando hay presente una cantidad suficiente de droga, la droga saturará los anticuerpos, y el conjugado detectable marcador-anticuerpo 34 no puede enlazarse con los conjugados 30 de analitos de droga y proteína sobre la membrana 24. Por lo tanto, la ausencia de una banda de color en la región 26 de prueba visualmente observable indica un resultado positivo para esa prueba particular.

35 También se proporciona un control para la primera tira reactiva 12 del aparato 10 de la presente invención, para garantizar que el procedimiento de prueba se haya llevado a cabo debidamente. Siempre debería aparecer una banda en la región 28 de control en la membrana 24 con independencia de la presencia de una droga o un metabolito de droga para indicar que el dispositivo y los componentes son operables.
40

Más específicamente, y con referencia a las Figuras 4-6, el marcador 36 es oro coloidal u otras macropartículas, como partículas coloreadas de látex, que están sensibilizadas con anticuerpos purificados específicos a las drogas de la prueba y un control, y son depositadas en la almohadilla 22 de conjugados a lo largo del recorrido del flujo de la muestras 16. El oro coloidal puede oscilar en tamaño entre 10 nm y 60 nm. Las micropartículas, como partículas coloreadas de látex, pueden ser de aproximadamente 400 nm. Estos conjugados marcador-anticuerpo no están inmovilizados en la almohadilla 22 de conjugados, sino que, más bien, son libremente amovibles desde la misma. Las partículas del marcador detectable 36 pueden ser de cualquier color. El marcador detectable 36 es bloqueado con una solución tampón proteínica para evitar la agregación inespecífica.
45

50 La prueba se lleva a cabo como sigue. Se aplica la muestra 16 a la almohadilla 20 de recogida y es llevada por capilaridad hasta la almohadilla 22 de conjugados. En la realización ilustrada, se dispone una almohadilla 40 de muestras entre la almohadilla 20 de recogida y la almohadilla 22 de conjugados (Fig. 3). A medida de que la muestra 16 pasa por capilaridad a través de la almohadilla 22 de conjugados, moviliza los conjugados marcador-anticuerpo 34 de la almohadilla 22 de conjuntados. Los conjugados marcador-anticuerpo 34 pasan entonces por capilaridad de la almohadilla 22 de conjugados a la membrana 24 mediante una acción de efecto mecha (como una acción capilar) y hasta las zonas 54 de reacción, y más allá, de la región 26 de prueba. En ausencia de uno o varios analitos de droga en la muestra 16 que sean específicos para los conjugados 30 de analitos de droga y proteína en la primera tira reactiva 12, los conjugados marcador-anticuerpo 34 se enlazan a los conjugados específicos 30 de analitos de droga y proteína que están inmovilizados en las zonas 54 de reacción a través de la creación de inmunocomplejos, formando líneas definidas visibles. Esta es una prueba negativa: si aparece una línea en una zona 54 de reacción específica para una droga de adicción particular, la prueba es negativa para esa droga particular de adicción.
60

En presencia de analitos específicos en la muestra 16, el conjugado marcador-anticuerpo 34 en la almohadilla 22 de conjugados se enlazarán a esos analitos en la muestra y, así, no se enlaza con los conjugados 30 de analitos de droga y proteína que están inmovilizados en las zonas 54 de reacción. Así se evita la formación de inmunocomplejos entre los conjugados 30 de analitos de droga y proteína en las zonas 54 de reacción y del conjugado marcador-anticuerpo 34. Por lo tanto, en una prueba positiva no se formarán líneas en la zona 54 de reacción.

En un extremo de la membrana 24 está la región 28 de control de referencia con una reacción diferente de los anticuerpos a los antígenos. En particular, el anticuerpo de cabra anticonejo se inmoviliza en la membrana 24. El conjugado 34 procedente de la almohadilla de conjugados que incluye un marcador detectable 36 siempre se enlaza en la región 28 de control durante una prueba viable. La línea creada en la región 28 de control indica que la prueba es viable y sirve como control de referencia. Si el dispositivo de prueba ha sido debidamente almacenado, se usa correctamente y está dentro del límite temporal de caducidad, la línea de control siempre debería estar presente. Por lo tanto, en la realización ilustrada, para todas las pruebas negativas, habrá líneas visibles. Así, con múltiples analitos objeto de prueba, si todas las pruebas son negativas, habrá líneas visibles en cada una de las zonas 54 de reacción. Si solo son negativas ciertas pruebas, habrá líneas visibles en algunas zonas 54 de reacción y estarán ausentes en otras. Para las pruebas positivas para cada analito, solo habrá una línea visible, es decir, la línea de control de referencia. Los expertos en la técnica reconocerán, además, que no es preciso usar líneas para indicar los resultados de prueba y/o de control. Pueden usarse otros símbolos, incluyendo, sin limitación, "+", "-", "POS" y "NEG".

Aunque se describe que el dispositivo de prueba tiene una primera tira reactiva 12, tal realización es meramente ejemplar y se reconocerá que puede haber presentes múltiples tiras reactivas inmunocromatográficas en el alojamiento del dispositivo de la presente invención. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir dos tiras reactivas de inmunoensayo, con zonas de reacción y de control, siendo visible una tira a través de una primera ventana y siendo visible la otra tira a través de una segunda ventana. Como ejemplo adicional, el dispositivo puede incluir dos tiras reactivas de inmunoensayo, siendo ambas visibles a través de la misma ventana. Como ejemplo adicional, el dispositivo puede incluir más de dos tiras reactivas, con zonas de prueba y de control visibles a través de las mismas ventanas o de ventanas separadas.

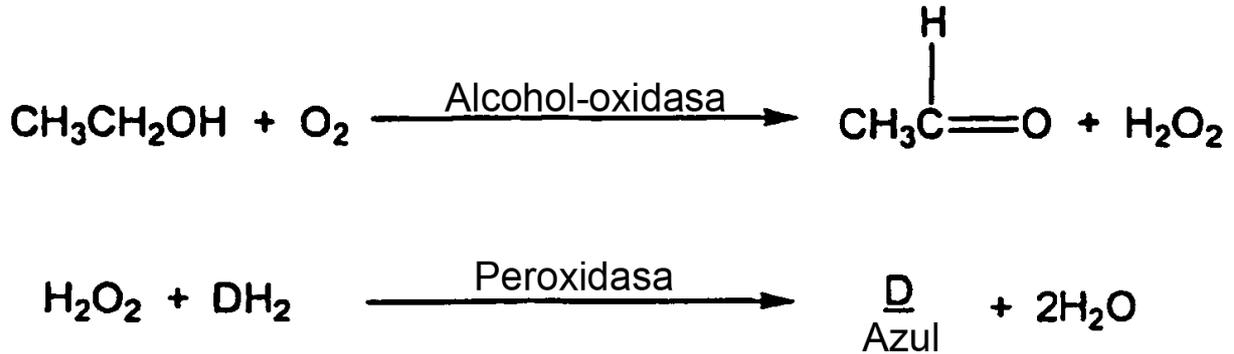
El alojamiento 18 del aparato 10 de la presente invención no solo incluye una prueba de detección de drogas de adicción según se ha descrito en lo que antecede, sino que también incluye una prueba de la presencia de alcohol. Está bien establecido que la concentración de alcohol en el fluido oral es comparable a la del alcohol en la sangre. La prueba de detección de alcohol, en una realización particular de la presente invención, es una prueba enzimática. La prueba enzimática de presencia del alcohol incluye una almohadilla 46 de reacción enzimática que incluye alcohol-oxidasa y peroxidasa. Esta almohadilla 46 de reacción está en comunicación de acción capilar con una membrana de acción capilar que, a su vez, está en comunicación de acción capilar con la almohadilla 20 de recogida. La almohadilla 46 de reacción, al contacto con soluciones de alcohol, tal como alcohol presente en el fluido oral, cambiará rápidamente a diferentes colores, en una realización, de matices de verde al azul, dependiendo de la cantidad de alcohol presente. La prueba se usa aplicando una muestra, como fluido oral, a la membrana de acción capilar. La muestra se desplaza entonces mediante la acción capilar a la almohadilla 46 de reacción enzimática.

La almohadilla 46 de reacción contiene un sistema reactivo. El sistema reactivo, tal como se describe brevemente en lo que antecede y con más detalle aquí, está compuesto de alcohol-oxidasa estabilizada, una oxidasa y un aceptor de oxígeno de color cambiante que incluye cromógeno. También puede contener otros materiales. "Alcohol-oxidasa estabilizada" puede significar alcohol-oxidasa que retenga al menos un 50% de su actividad, en una realización, y al menos un 70% de su actividad, en otra realización, cuando se almacena en forma seca a 56°C durante quince días. La alcohol-oxidasa estabilizada en su forma más simple comprende alcohol-oxidasa en mezcla íntima con una concentración estabilizante efectiva de proteínas estabilizantes.

El sistema reactivo incluye, además, una peroxidasa (cualquier material que tenga actividad peroxidativa). Este material promueve la reacción del peróxido de hidrógeno, generado por la reacción de etanol con oxígeno con el aceptor de oxígeno de color cambiante. Aunque pueden emplearse peroxidases enzimáticas de plantas, como la peroxidasa de rábano picante o la peroxidasa de patata, también pueden emplearse diversas peroxidases orgánicas o inorgánicas adicionales. Estas incluyen compuestos orgánicos como algunas de las porfirinas, así como compuestos inorgánicos como yoduros de amonio o de metales alcalinos, sulfatos crómicos de metales alcalinos, ferrocianuro de hierro, cloruro ferroso y sulfocianato de hierro y similares, como conocen los expertos en la técnica. También puede usarse peroxidasa de levadura. La peroxidasa promueve la reacción del peróxido de hidrógeno con el aceptor de oxígeno de color cambiante.

En una realización, el sistema reactivo incluye tetrametilbencidina (0,176 mg), alcohol-oxidasa (EC 1.1.3.1.3) (0,5 IU), peroxidasa (EC 1.11.1.7) (30 IU), un tampón (0,747 mg) y proteínas estabilizantes (0,19 mg).

En una realización, la almohadilla 46 de reacción emplea una química de fase sólida que usa la siguiente reacción enzimática altamente específica:



La prueba de detección de alcohol también incluye un inhibidor de reacción. Este inhibidor de reacción se usa para controlar la temporización del resultado de la prueba de detección de alcohol controlando la velocidad de la reacción enzimática. El inhibidor de reacción puede ser un agente de apagado que consume el peróxido de hidrógeno del sistema reactivo. En una realización, el agente de apagado usado como inhibidor de reacción es la vitamina C.

5 La almohadilla 46 de reacción de alcohol del aparato 10 de la presente invención reaccionará con los alcoholes de metilo, etilo y alilo. El aparato 10 puede estar formado de tal forma que la reacción de la prueba de detección de alcohol no se efectúe en presencia de alcoholes que tengan 5 o más átomos de carbono, ni con glicina, glicerol o serina. La reacción se efectuará en presencia de alcoholes de metilo, etilo y alilo. Esta propiedad es un resultado de la especificidad de la enzima alcohol-oxidasa extraída de la levadura.

10 Una vez que se ha llevado a cabo una prueba de detección de alcohol usando el aparato 10, puede compararse el color de la almohadilla 46 de reacción con una tabla de colores (tal como la que puede ponerse en el envase de la prueba) para estimar la concentración aproximada de alcohol en sangre del sujeto.

15 La integridad de la almohadilla 46 de reacción puede ser cualitativamente verificada usando una solución de prueba preparada añadiendo cuatro gotas de licores destilados de grado 80 a 0,24 l de agua. Esta solución puede ser aplicada entonces a la almohadilla de reacción. La solución debería proporcionar una reacción de color igual o mayor (más oscura) que un color que aparecería para un 0,04% de alcohol en sangre.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (10) para la prueba de múltiples analitos que comprende:
 - un alojamiento (18) que contiene:
 - una almohadilla (20) de recogida de muestras que se extiende parcialmente desde dicho alojamiento (18), estando dicha almohadilla de recogida de muestras en comunicación de acción capilar con:
 - un único material (15) de refuerzo que soporta, en una primera tira reactiva (12), componentes que comprenden una almohadilla (40) de muestras y una almohadilla (42) de absorción en comunicación de acción capilar para un inmunoensayo y, en una segunda tira reactiva (14), reactivos para una reacción enzimática;
 - por lo que una muestra en la almohadilla (20) de recogida se comunica con las tiras reactivas primera (12) y segunda (14) para la detección tanto inmunológica como enzimática de uno o varios analitos contenidos en la muestra, en el que las tiras reactivas primera (12) y segunda (14) están asociadas cada una con la almohadilla (20) de recogida, pero no están asociadas entre sí,

en el que dicha almohadilla (40) de muestras y dicha almohadilla (42) de absorción están cada una en comunicación de acción capilar con dicha primera tira reactiva.
2. El aparato de la reivindicación 1 en el que dicha primera tira reactiva (12) y dicha segunda tira reactiva (14) están dispuestas al menos parcialmente dentro de dicho alojamiento (18).
3. El aparato de la reivindicación 1 en el que dicha almohadilla (20) de recogida de muestras está adaptada para recibir una muestra fluida, preferentemente en la que dicha muestra fluida es un fluido oral.
4. El aparato de la reivindicación 1 en el que dicha primera tira reactiva (12) comprende, además, una almohadilla (22) de conjugados y una membrana (24) de ensayo en comunicación de acción capilar mutua.
5. El aparato de la reivindicación 4 que, además, comprende un primer trazador depositado en dicha almohadilla (22) de conjugados de tal forma que sea libremente amovible con respecto a la misma en presencia de un fluido.
6. El aparato de la reivindicación 5 en el que dicho primer trazador comprende un anticuerpo de analito conjugado con un marcador detectable.
7. El aparato de la reivindicación 6 en el que dicho primer trazador incluye una pluralidad de anticuerpos a una pluralidad de analitos, estando conjugado cada uno de dicha pluralidad de anticuerpos con un marcador detectable.
8. El aparato de la reivindicación 7 en el que dicho marcador detectable está seleccionado del grupo que consiste en oro coloidal y partículas coloreadas de látex.
9. El aparato de la reivindicación 4 que, además, comprende un trazador de control depositado en dicha almohadilla (22) de conjugados, siendo dicho trazador de control libremente amovible con respecto a la misma en presencia de un fluido.
10. El aparato de la reivindicación 4 que, además, comprende una pluralidad de analitos inmovilizados en dicha membrana (24) de ensayo, preferentemente en el que dicha pluralidad de analitos está seleccionada del grupo que consiste en analitos de cocaína, d-metanfetamina, 11-nor-[Delta]9-tetrahidrocannabinol, d-anfetamina, opiáceos y fenciclidina.
11. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicha membrana (24) de ensayo incluye una pluralidad de zonas de reacción, en el que cada una de dicha pluralidad de zonas de reacción incluye uno de dicha pluralidad de analitos inmovilizado en la misma, incluyendo cada uno de dicha pluralidad de subconjuntos múltiples analitos de un solo tipo.
12. El aparato de la reivindicación 11 que, además, comprende una pluralidad de trazadores que incluye un anticuerpo de analito conjugado con un marcador detectable, siendo específico cada uno de dichos anticuerpos a uno de dicha pluralidad de analitos, depositándose dicha pluralidad de trazadores en dicha almohadilla de conjugados y siendo libremente amovible con respecto a la misma en presencia de un fluido, de tal modo que, cuando dichos anticuerpos se enlazan a dicha pluralidad de analitos en dichas zonas de reacción con una concentración predeterminada, dicho marcador detectable sea visible al ojo humano.
13. El aparato de la reivindicación 1 en el que dicha segunda tira reactiva (14) comprende, además, una tira (44) de acción capilar y una almohadilla (46) de reacción.

14. El aparato de la reivindicación 13 en el que dichos reactivos están dispuestos sobre dicha almohadilla (46) de reacción, preferentemente en el que dichos reactivos están seleccionados del grupo que consiste en tetrametilbencidina, alcohol-oxidasa, peroxidasa, tampones y proteínas estabilizantes.
- 5 15. El aparato de la reivindicación 14 en el que dichos reactivos producen una reacción enzimática en presencia de alcohol.
16. El aparato de la reivindicación 15 en el que dicha almohadilla (46) de reacción presenta un primer color en ausencia de alcohol y presenta un segundo color en presencia de alcohol.
17. El aparato de la reivindicación 1 en el que dicho alojamiento (18), además, comprende al menos una ventana (52) a través de la cual puede observarse un área de reacción de una membrana de nitrocelulosa.
- 10 18. Un procedimiento para el ensayo tanto de drogas de adicción como de alcohol, comprendiendo el procedimiento: proporcionar un aparato (10) según al menos una de las reivindicaciones 1 a 17, proporcionar una muestra de fluido oral a la almohadilla (20) de recogida, iniciando con ello dicho inmunoensayo y dicha reacción enzimática; y detectar resultados de dicho inmunoensayo y dicha reacción enzimática.
- 15 19. Un procedimiento de preparación de un aparato (10) para comprobar la presencia de drogas de adicción o de alcohol en una muestra, comprendiendo el procedimiento: proporcionar un alojamiento (18) que contiene una almohadilla (20) de recogida de muestras que se extiende parcialmente desde dicho alojamiento (18); y proporcionar un único material (15) de refuerzo que soporta unas tiras reactivas primera (12) y segunda (14), teniendo dicha primera tira reactiva (12) componentes que comprenden una almohadilla (40) de muestras y una almohadilla de absorción en comunicación de acción capilar para un inmunoensayo, estando dicha primera tira reactiva (12) en comunicación de acción capilar con dicha almohadilla (20) de recogida; y una segunda tira reactiva (14) que tiene componentes para una reacción enzimática, estando dicha segunda tira reactiva (14) en comunicación de acción capilar con dicha almohadilla (20) de recogida, en el que las tiras reactivas primera (12) y segunda (14) están cada una asociada con la almohadilla (20) de recogida, pero no están asociadas entre sí,
- 20
- 25 en el que dicha almohadilla (40) de muestras y dicha almohadilla (42) de absorción están cada una en comunicación de acción capilar con dicha primera tira reactiva.

