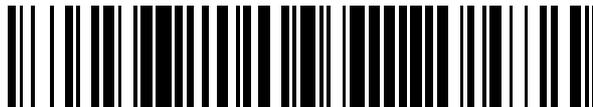


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 977**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2011 E 11719501 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2564196**

54 Título: **Sistema microfluídico con tratamiento previo de muestras**

30 Prioridad:

**26.04.2010 EP 10161025**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.02.2016**

73 Titular/es:

**SECURETEC DETEKTIONS-SYSTEME AG  
(100.0%)  
Lilienthalstrasse 7  
85579 Neubiberg, DE**

72 Inventor/es:

**ABERL, FRANZ;  
STADTHAGEN, TORSTEN y  
KLAUS, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 559 977 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**

Sistema microfluídico con tratamiento previo de muestras

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de un analito, así como a un dispositivo apropiado a tal efecto.

5 Los ensayos inmunológicos constituyen un componente importante de procedimientos de análisis relevantes desde el punto de vista clínico, que se basan en la formación de complejos inmunológicos a partir de antígenos y anticuerpos, y sirven para la identificación de analitos, a modo de ejemplo en el sector de la analítica médica, medioambiental, alimentaria y agraria, en muestras líquidas. Debido a las propiedades biofísicas y bioquímicas, los ensayos inmunológicos ofrecen en general una alta especificidad y sensibilidad al enlace antígeno-  
10 anticuerpo, con gasto en instalaciones y económico relativamente reducido, y presentan en este sentido ventajas significativas frente a procedimientos de identificación alternativos.

Otro campo de aplicación de ensayos inmunológicos significativo en la práctica constituye la identificación de drogas en líquidos corporales, o en superficies contaminadas con drogas. En el ámbito de tales ensayos se toma habitualmente una muestra de analito con un elemento de extracción de muestras apropiado de una  
15 superficie, el elemento de extracción de muestras humedecido con el analito se pone en contacto con una tira de ensayo, y el analito eliminado a partir del elemento de extracción de muestras y transferido a la tira de ensayo se detecta por medio de una reacción de identificación inmunológica.

Un aspecto que posee un significado destacado especialmente en la identificación de drogas (por ejemplo anfetamina, metanfetamina, cannabis, cocaína, heroína), es la especificidad, sensibilidad y rapidez del ensayo  
20 empleado. En este caso existe por una parte la necesidad respecto a procedimientos de identificación altamente sensibles, para poder identificar la presencia de drogas de manera segura y rápida, incluso en el caso de volúmenes de muestra reducidos, o bien en el caso de empleo de materiales de muestra complejos, como saliva. Por otra parte, los formatos de ensayo debían presentar también una alta especificidad para la sustancia a identificar en cada caso, para excluir resultados de medida falsos positivos, y proporcionar además  
25 en este sentido una información fiable sobre la droga concreta de la que se trata en el caso de la sustancia sometida a ensayo.

El documento EP 0 699 906 A2 da a conocer un ensayo rápido de detección de drogas, que es adquirible comercialmente como ensayo de superficie, sudor, o bien saliva, bajo la denominación DrugWipe® (firma Securetec Detektionssysteme AG). El ensayo hace uso de un elemento limpiador constituido esencialmente por  
30 material sintético ("espátula") con vellón aplicado por soldadura, por medio del cual se toma una muestra de analito (por ejemplo de una superficie o de una disolución), y a continuación se transfiere directamente a una tira de ensayo inmunocromatográfica, que está alojada en una carcasa desechable (tecnología "Lateral Flow").

Mediante inmersión de la tira de ensayo en una disolución acuosa (agua o tampón con diversos reactivos) se inicia la cromatografía, pudiéndose leer el resultado de la determinación a simple vista o bajo empleo de un  
35 dispositivo de medida apropiado. La identificación del analito se efectúa ligándose a una línea de ensayo anticuerpos enlazados con la molécula de droga (antígeno), y formando una línea de color debido a su marcaje dorado, que se puede detectar ópticamente en la ventana de lectura. Anticuerpos que no están cargados con moléculas de droga se capturan por medio de haptenos, que se presentan en la tira de ensayo en forma inmovilizada, antes de alcanzar la línea de ensayo.

40 En comparación con todos los demás ensayos rápidos de detección de drogas que se encuentran en el mercado, DrugWipe® y Triage® (firma Biosite) son los únicos productos que forman una línea de color en el caso de presencia de un analito determinado en una muestra, y presentan en este sentido la denominada indicación positiva. Todos los demás productos comerciales disponen de un indicador negativo, en el que la no  
45 aparición de una línea se valora como identificación positiva para el respectivo analito. Otra gran ventaja de DrugWipe® es el volumen de muestra reducido, que se requiere para la identificación de drogas y otras sustancias. Mientras que en el caso de DrugWipe® es suficiente un volumen de muestra de aproximadamente 1 – 20 µl, otros ensayos comerciales requieren un volumen de muestra de al menos 100 µl hasta varios mililitros.

El ensayo rápido desarrollado por la firma Varian OraLab® sirve para la identificación de drogas a partir de  
50 muestras de saliva, y se basa igualmente en la tecnología Lateral Flow. Mientras que la especificidad del ensayo se sitúa en aproximadamente un 90-100 %, la sensibilidad en el caso de anfetaminas y opiáceos se sitúa únicamente entre un 50 y un 90 %, en el caso de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol y cocaína se sitúa en parte incluso claramente por debajo de un 50 % (véase estudio DRUID, <http://www.druid-project.eu>). Un gran inconveniente de este ensayo se sitúa además en que se requieren volúmenes de muestra relativamente grandes, que no se  
55 encuentran disponibles en el caso de consumidores de drogas agudos.

El ensayo rápido DrugCheck® 5000 de la firma Dräger, que se basa igualmente en la tecnología Lateral-Flow, constituye un sistema de ensayo útil para la identificación de drogas según los datos del estudio DRUID (<http://www.druid-project.eu>). Sin embargo, este formato de ensayo posee el inconveniente significativo de que los resultados en una tira de ensayo se pueden valorar solo por medio de un aparato de lectura, que es muy caro en su adquisición, y es sólo parcialmente apropiado para el duro campo de empleo en exterior. En este sentido, para este ensayo resultan problemas considerables respecto a la economía y al fácil manejo.

El kit de ensayo Rapid STAT®, ofrecido por la firma Mavand, representa otro ensayo rápido de detección de drogas adquirible comercialmente, en el que una muestra de saliva diluida con tampón se incuba en una tira de ensayo inmunocromatográfica con componentes de enlace marcados, y que, según datos del fabricante, posibilita una identificación hasta un límite inferior de 15 ng/ml en  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol.

Un inconveniente significativo de este ensayo es su manejo extremadamente complejo y complicado, que lo hace inapropiado precisamente para una aplicación en la policía de tráfico, así como la especificidad relativamente reducida para  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, de un 80-90 % (véase estudio DRUID, <http://www.druid-project.eu>). Según un estudio de la universidad de Mainz, el índice de resultados de ensayo falsos positivos para  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol se sitúa en más de un 10 %, y la especificidad total se sitúa en un 84 % (publicado en GTFCH 2009, Mosbach, [http://www.gtfch.org/cms/images/stories/media/tk/tk76\\_2/abstractsposter.pdf](http://www.gtfch.org/cms/images/stories/media/tk/tk76_2/abstractsposter.pdf)).

Los documentos US 7 090 803 B1 y US 7 507 374 (o bien US 2006/029035A1) dan a conocer respectivamente dispositivos para la determinación de un analito en una muestra de saliva, que comprenden una carcasa para el alojamiento de un elemento de extracción de muestras, un dispositivo de sujeción para el alojamiento de al menos una tira de ensayo cromatográfica, una primera cámara para el almacenaje de un primer reactivo, como por ejemplo una disolución tampón, una segunda cámara para el almacenaje de un segundo reactivo específico para el analito, medio para la puesta en contacto con la muestra con el primer reactivo, medio para la puesta en contacto de la mezcla de muestra y el primer reactivo con el segundo reactivo en la segunda cámara, así como medio para la puesta en contacto de la mezcla de muestra, primer reactivo y segundo reactivo con la tira de ensayo cromatográfica.

En este caso se introduce en particular un elemento de extracción de muestras, que comprende en un extremo un material esponjoso con una muestra de analito absorbida en el mismo, en la carcasa a través de una escotadura cilíndrica, y la muestra de analito se exprime en la escotadura desde el material esponjoso mediante presión del elemento de extracción de muestras. En este caso, a través de un orificio que se encuentra en el fondo de la escotadura, la muestra llega a la segunda cámara, donde se libera mediante puesta en contacto con un objeto afilado desde una envoltura deformable, y llega a la segunda cámara a través de un orificio que se encuentra en el fondo de la primera cámara, y se mezcla con el segundo reactivo. La mezcla se incuba a continuación durante algunos minutos, y acto seguido se pone en contacto con la tira de ensayo cromatográfica, posibilitando la última una determinación visual del resultado de ensayo.

Los dispositivos, o bien procedimientos dados a conocer en el documento US 7 090 803 B1 y US 7 507 374 B2 poseen el inconveniente de que la muestra de analito se comprime únicamente por vía mecánica mediante prensado del elemento de extracción cilíndrica en la escotadura cilíndrica del dispositivo de ensayo desde el material esponjoso. De este modo, por un lado solo una parte reducida de la muestra absorbida originalmente llega a la segunda cámara, en la que la muestra se incuba con el primer y el segundo reactivo, y el analito se une a su componente de enlace específico para el analítico, lo que reduce en último término la sensibilidad de la determinación de analito. Por otra parte, debido a la acción absorbente del material esponjoso, se requieren grandes volúmenes de muestra, que no se encuentran disponibles generalmente en la práctica.

El documento US 2008/0166820 A1 describe un kit para la determinación de un analito en un fluido corporal, que contiene un elemento de extracción de muestras para el alojamiento de una muestra de analito, una ampolla con una disolución tampón contenida en la misma, un elemento de transferencia para la extracción de disolución de la ampolla y para la transferencia de la disolución a un dispositivo de análisis, así como un dispositivo de análisis. El dispositivo de análisis comprende por su parte al menos una zona de reacción, que está configurada para el alojamiento de la disolución tampón, y un componente de enlace específico para el analito, una tira de ensayo cromatográfica, así como medios para la puesta en contacto de la tira de ensayo cromatográfica con la disolución tampón.

Para la determinación del analito se introduce el elemento de extracción de muestras en la ampolla cargada con disolución tampón, succionándose completamente con la disolución tampón la zona del elemento de extracción de muestras, impregnada con una muestra de analito, y eluyéndose el analito en la disolución tampón mediante presión subsiguiente del elemento de extracción de muestras. Tras eliminación del elemento de extracción de muestras, una parte de la disolución tampón que contiene analito se extrae de la ampolla, y se transfiere al dispositivo de análisis, en el que el analito se incuba durante algunos minutos con el componente de enlace específico para el analítico, y a continuación se pone en contacto con la tira de ensayo cromatográfica.

El kit dado a conocer en el documento US 2008/0166820 A1 posee el inconveniente de ser complicado de manejar debido a la pluralidad de componentes aislados, y por consiguiente no entra en consideración para una aplicación segura, a modo de ejemplo como ensayo rápido de detección de drogas para el empleo en campo. Además existe la necesidad de extraer de la ampolla la disolución tampón que contiene analito, y transferir la misma a un dispositivo de análisis separado de la misma, el peligro de pérdidas de muestras, o bien el peligro de una contaminación de muestra, lo que puede conducir en último término a una reducción de la sensibilidad, o bien especificidad del resultado del ensayo, y limita en gran medida la fiabilidad total del ensayo.

El documento EP 0 634 215 A1 da a conocer un procedimiento para la identificación de analitos en un líquido corporal, que posibilita una determinación uniforme de analitos esencialmente simultánea, en diferentes puntos de extracción, en varios elementos de ensayo. Para la puesta en práctica del procedimiento, en este caso se emplea un dispositivo que comprende un punto de alimentación de muestras para la aplicación de la muestra, varias zonas de extracción de muestras separadas, que están unidas respectivamente con el punto de alimentación de muestras por un tramo de transporte capilar, y varios elementos de ensayo para la determinación aislada de analitos, estando prevista en al menos uno de los tramos de transporte una zona de retraso para el retardo del transporte de líquido del punto de alimentación de muestras a la zona de extracción de muestras.

Un inconveniente del formato de ensayo representado en el documento EP 0 634 215 A1 consiste en que el analito que se encuentra en la muestra no se incuba en una zona separada del elemento de ensayo con un componente de enlace específico para el analito, tras lo cual la zona de retardo, presente obligatoriamente, no contiene ningún componente de enlace específico para el analito, y se debe evitar únicamente una inundación del ensayo a través de la muestra, o bien se debe asegurar una humectación uniforme de los elementos de ensayo aislados con la muestra. De este modo no se da la base para una cinética óptima entre analito y componente de enlace específico para el analito, debido a la cual se limitan claramente sensibilidad y especificidad, en especial en la identificación de analitos poco hidrosolubles (hidrófobos).

El documento EP 0 811 847 A2 da a conocer un procedimiento para la identificación de un analito en un líquido corporal, o bien en una superficie contaminada. En este caso, para la puesta en práctica del procedimiento se emplea respectivamente un kit de ensayo, que comprende una tira de ensayo de uno o varios materiales con actividad capilar, aptos para cromatografía, un elemento de extracción de muestras separado de la superficie de la tira de ensayo, así como un dispositivo de presión para la puesta en contacto de superficie de tira de ensayo y elemento de extracción de muestras, pudiendo estar humedecido el elemento de extracción de muestras con el tampón acuoso, un detergente y/o un disolvente orgánico, con el fin de una mejor absorción del analito.

El test descrito en el documento EP 0 811 847 A2 tiene el inconveniente de que la muestra que contiene los analitos no se elabora de ningún modo antes de la puesta en contacto con el elemento de ensayo, lo que es significativo en especial en la determinación de muestras biológicas con composición química compleja (por ejemplo sangre, saliva o sudor). Sin considerar el hecho de que las muestras biológicas por sí mismas están sujetas a una amplitud de oscilación dependiente de la persona, en especial la estructura de la matriz de muestra (por ejemplo viscosidad, contenido proteico, etc.) tiene una gran influencia sobre la identificación de analitos, ya que la sensibilidad del procedimiento de identificación es dependiente en gran medida de la accesibilidad del analito para el componente de enlace específico para el analito.

Otro inconveniente del formato de ensayo descrito en el documento EP 0 811 847 A2 consiste en que el analito que se encuentra en la muestra, por su parte, no se incuba en una zona separada del elemento de ensayo con un componente de enlace específico para el analito. De este modo no se da una cinética óptima entre analito y componente de enlace específico para el analito, debido a lo cual la sensibilidad y la especificidad, en especial en el caso de identificación de analitos poco hidrosolubles, están limitadas en gran medida.

El documento US 6 203 757 B1 da a conocer un procedimiento para la identificación de analitos en un líquido corporal, que prevé una determinación simultánea de varios analitos por medio de una única muestra. Para la puesta en práctica del procedimiento se emplea un dispositivo de ensayo que comprende al menos dos tiras de ensayo, de disposición esencialmente paralela entre sí, así como un elemento distribuidor de muestras configurado en forma de V o en forma de W, que posibilita una comunicación fluida entre el punto de alimentación de muestras y la tira de ensayo aislada. En una forma de ejecución, en el caso del analito se puede tratar de una molécula de droga, que se detecta, a modo de ejemplo, por medio de un ensayo inmunológico enzimático.

Un inconveniente del procedimiento de identificación descrito en el documento US 6 203 757 B1 consiste en que la muestra goteada en el dispositivo de ensayo, antes de la puesta en contacto de analito y componente de enlace específico para el analito, se transporta a lo largo de un material tipo tejido. Debido al hecho de que los materiales tipo tejido presentan habitualmente superficies muy grandes, a las que se debe unir el analito de manera inespecífica, en tales test ya no se dispone frecuentemente de la cantidad total de analito presente en la

muestra para una reacción con el componente de enlace específico para el analito. Esto es desfavorable sobre todo en la identificación de analitos poco hidrosolubles, y limita de manera dramática la sensibilidad en algunos casos.

5 Otro inconveniente del formato de ensayo descrito en el documento US 6 203 757 B1 consiste en que el analito que se encuentra en la muestra tampoco se incubaba en una zona separada del elemento de ensayo con un componente de enlace específico para el analito. De este modo se limita en gran medida la sensibilidad y especificidad del ensayo, en especial en el caso de identificación de analitos poco hidrosolubles (hidrófobos), por lo cual especialmente la identificación de analitos, que están presentes en la muestra a investigar solo en baja concentración, adolece de problemas.

10 El documento WO 01/35094 A1 da a conocer un kit de ensayo para la identificación de analitos en un líquido corporal, que está constituido por una carcasa obturable, un depósito colector alojado en la misma para el alojamiento de líquidos corporales, y al menos una tira de ensayo.

15 Partiendo de los sistemas de ensayo descritos anteriormente, la tarea que motiva la presente invención consistía, por consiguiente, en poner a disposición un procedimiento para la determinación de un analito, en especial para la determinación de drogas, en el que se eliminaran al menos parcialmente los inconvenientes del estado de la técnica. El procedimiento para todos los analitos a analizar debía presentar en especial una sensibilidad y una especificidad elevadas, debía ser fácil de manejar, y posibilitar una rápida determinación sin el empleo de agentes auxiliares técnicos adicionales para la lectura de los resultados de ensayo.

20 Según la invención, este problema se soluciona mediante un procedimiento para la determinación de un analito, que comprende los pasos:

- (a) puesta a disposición de un dispositivo de análisis microfluídico, que comprende al menos una primera, una segunda y una tercera zona, estando unida la primera zona con la segunda zona y la segunda zona con la tercera zona por medio de microcanales, etapas, ramificaciones y/o cámaras,
- 25 (b) toma de una muestra que contiene el analito de una superficie de muestra con un elemento de extracción de muestras,
- (c) introducción del elemento de extracción de muestras en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico, y elución del analito en la primera zona con un agente eluyente,
- (d) transferencia del eluato obtenido en el paso (c) a la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico y puesta en contacto del eluato con un componente de enlace específico para el analito  
30 alojado en la segunda zona durante un intervalo de tiempo de al menos 3 segundos en ausencia de un elemento de ensayo útil para la identificación del analito, efectuándose un enlace del analito con el componente de enlace específico para el analito,
- (e) transferencia de la mezcla obtenida en el paso (d) a la tercera zona del dispositivo de análisis microfluídico, y puesta en contacto de la mezcla con al menos un elemento de ensayo alojado en la  
35 tercera zona, útil para la determinación del analito, y
- (f) determinación de la presencia y/o de la cantidad de analito en el elemento de ensayo.

40 Sorprendentemente, en el ámbito de la presente invención se determinó que, por medio del procedimiento según la invención, se pueden identificar analitos de manera sencilla y reproducible con sensibilidad y especificidad elevadas, sin que a tal efecto sean necesarias grandes cantidades de muestra y/o agentes auxiliares técnicos complejos para la lectura de los resultados de ensayo.

45 El primer paso del procedimiento según la invención requiere la puesta a disposición de un dispositivo de análisis microfluídico apropiado para la determinación del analito, que comprende al menos una primera, una segunda y una tercera zona. La primera zona del dispositivo de análisis microfluídico está configurada para la introducción de un elemento de extracción de muestras, por medio del cual se absorbió previamente una muestra de analito, así como para la subsiguiente elución del analito del elemento de extracción de muestras con un agente eluyente, mientras que la segunda zona contiene un componente de enlace específico para el analito y está en comunicación fluida con la primera zona. La tercera zona comprende finalmente al menos un elemento de ensayo para la determinación de la presencia y/o de la cantidad de analito, y está en comunicación fluida con la segunda zona.

50 Las respectivas zonas del dispositivo de análisis microfluídico están unidas entre sí por medio de estructuras microfluídicas, como por ejemplo a través de microcanales, etapas, ramificaciones y/o cámaras, y de este modo posibilitan una transferencia, o bien un procesado de fluidos dentro del dispositivo de análisis. Las estructuras microfluídicas, como se citan anteriormente, se pueden obtener mediante procedimientos conocidos por el especialista, como por ejemplo mediante fresado con arranque de viruta o moldeo por inyección,  
55 correspondientemente a los respectivos requisitos en el dispositivo de análisis, a partir de materiales apropiados, en especial a partir de material sintético.

Para la determinación del analito, en el siguiente paso del procedimiento según la invención se absorbe una muestra que contiene los analitos por medio de un elemento de extracción de muestras de una superficie a analizar (por ejemplo lengua, piel, otras superficies). En este caso se puede emplear como elemento de extracción de muestras en principio cualquier elemento que es capaz de absorber una muestra de analito, y desprender de nuevo la misma casi de manera cuantitativa, es decir, en una cantidad de  $\geq 95$  % en peso, referido al peso total de muestra absorbida, en el caso de contacto subsiguiente con un agente de elución. Los elementos de extracción de muestras que son apropiados para los fines de la presente invención se describen, a modo de ejemplo, en el documento EP 1 608 268 A1 y el documento WO 2004/086979 A1, a cuya manifestación se hace referencia en este caso.

El elemento de extracción de muestras, o bien una zona del elemento de extracción de muestras configurada para la absorción de la muestra, puede estar constituido en principio por cualquier material que parezca útil al especialista para los fines de la presente invención, y posibilite tanto un enriquecimiento de analito en el elemento de extracción de muestras, como también su posterior liberación en el caso de puesta en contacto con un agente eluyente. Además de los elementos de extracción de muestras descritos en el documento EP 1 608 268 A1 y el documento WO 2004/086979 A1, en este aspecto entran en consideración elementos de extracción de muestras que comprenden materiales absorbentes, en especial tejidos, vellones y/o matrices porosas (por ejemplo membranas y esponjas). Se describen vellones apropiados, a modo de ejemplo, en el documento DE 38 02 366 A1 y el documento EP 0 699 906 A2, a cuya manifestación se hace referencia expresamente.

Para garantizar una sensibilidad y especificidad elevadas en la determinación del analito, la superficie del elemento de extracción de muestras se puede someter a tratamiento químico previo antes del primer empleo; de este modo es posible mejorar la absorción del analito en la toma de la muestra o/y minimizar una adherencia del analito al elemento de extracción de muestras. En este aspecto, en una variante preferente, el procedimiento según la invención prevé que el elemento de extracción de muestras comprenda un reactivo de transferencia, que contiene al menos una proteína, al menos un hidrato de carbono, al menos un alcohol sacárico y/o al menos una sal, en especial una sal inorgánica.

El reactivo de transferencia, que favorece la transferencia del analito de la superficie de la muestra al elemento de extracción de muestras o/y la subsiguiente liberación del analito en el agente eluyente, en especial mediante bloqueo de puntos de enlace libres en el elemento de extracción de muestras o/y influencia de las propiedades del analito, puede estar impregnado, a modo de ejemplo, en el elemento de extracción de muestras con este fin. Las técnicas que se pueden emplear para la aplicación del reactivo de transferencia en el elemento de extracción de muestras, son conocidos generalmente por el especialista.

El concepto "hidrato de carbono", como se emplea en la presente solicitud, designa monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos de la fórmula aditiva general  $C_nH_{2n}O_n$ , que puede ser de origen natural o sintético en cada caso. En el ámbito de la invención se emplean preferentemente monosacáridos u oligosacáridos, aplicándose como monosacáridos en especial tetrosas, pentosas y hexosas presentes en la naturaleza, como por ejemplo eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, lixosa, xilosa, alosa, altrosa, galactosa, glucosa, idosa, manosa, talosa y fructosa, que se pueden presentar en la forma D o en la forma L en cada caso. Como oligosacáridos se pueden emplear en especial disacáridos y trisacáridos presentes en la naturaleza, como por ejemplo lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, gentianosa, cestosa y rafinosa. En una forma especialmente preferente de ejecución de la invención, el reactivo de transferencia contiene un hidrato de carbono seleccionado a partir del grupo constituido por glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa.

El concepto "alcohol sacárico", como se emplea en la presente solicitud, designa alcoholes de azúcares monosacáridos de la fórmula aditiva general  $C_nH_{2n+2}O_n$ , y alcoholes disacáridos de la fórmula aditiva general  $C_nH_{2n}O_{n-1}$ , que pueden ser de origen natural o sintético en cada caso. Los alcoholes de azúcares monosacáridos preferentes comprenden glicerol, eritritol, treitol, ribitol, arabinitol, xilitol, alitol, altritol, galactitol, glucitol, iditol y manitol, que se pueden presentar en la forma D o en la forma L en cada caso. Como alcoholes de azúcares disacáridos se pueden emplear en especial isomaltosa, lactitol y maltitol. En una forma especialmente preferente de ejecución de la invención, el reactivo de transferencia contiene un alcohol sacárico seleccionado a partir del grupo constituido por glucitol, glicerol, manitol y xilitol.

En el ámbito del procedimiento según la invención se emplea preferentemente un reactivo de transferencia que comprende (a) al menos una proteína seleccionada a partir del grupo constituido por gelatina, ovoalbúmina y albúmina de suero vacuno, (b) leche desnatada en polvo, (c) al menos un hidrato de carbono seleccionado a partir del grupo constituido por glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa, (d) al menos un alcohol sacárico seleccionado a partir del grupo constituido por glucitol, glicerol, manitol y xilitol, o/y (e) al menos una sal seleccionada a partir del grupo constituido por cloruro cálcico, cloruro potásico, cloruro de magnesio, cloruro sódico, y un borato. El reactivo de transferencia empleado según la invención comprende al menos una proteína seleccionada a partir del grupo constituido por gelatina, ovoalbúmina y albúmina de suero vacuno, o/y leche desnatada en polvo.

La concentración de al menos una proteína, al menos un hidrato de carbono, al menos un alcohol sacárico o/y al menos una sal en el reactivo de transferencia descrito anteriormente se puede adaptar a los analitos por el especialista correspondientemente a los respectivos requisitos, pero de modo habitual asciende aproximadamente a un 0,01 hasta aproximadamente un 15 % en peso, referido al peso total del reactivo de transferencia. En tanto el reactivo de transferencia contenga sales, éstas se añaden habitualmente en concentraciones de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 1 M.

Además de al menos una proteína, al menos un hidrato de carbono, al menos un alcohol sacárico y/o al menos una sal, el reactivo de transferencia puede contener, en caso dado, otros reactivos, que favorecen una transferencia del analito de la superficie a investigar al elemento de extracción de muestras o/y la liberación posterior del analito en el agente eluyente, como por ejemplo un detergente o/y un disolvente orgánico. Los ejemplos de detergentes comprenden, entre otros, colamidopropanosulfonato, octilglucósido, polidocanol, polialquilenglicoléter (por ejemplo Brij<sup>®</sup>, Synperonic<sup>®</sup>) y polisorbatos (por ejemplo Tween<sup>®</sup> 20, Tween<sup>®</sup> 80), que se emplean habitualmente en una concentración de aproximadamente un 0,01 a un 5 % en peso, referido al peso total de reactivo de transferencia. Los disolventes orgánicos ejemplares comprenden en especial dimetilsulfóxido, etanol, metanol, glicerina, así como mezclas de los mismos, que se añaden al reactivo de transferencia en una concentración habitualmente < 30 % en peso.

En una variante preferente, el procedimiento según la invención prevé el empleo de un elemento de extracción de muestras, que comprende un indicador de volumen. El indicador de volumen indica al usuario en la extracción de muestras si se tomó un volumen de muestra suficiente, definido, para la determinación. Esto es de significado decisivo en especial en la extracción de muestras de líquidos, como por ejemplo saliva, ya que, en general, sólo en el caso de puesta a disposición de un volumen de muestra definido se puede garantizar un rendimiento óptimo del respectivo sistema de ensayo. Se puede impedir una influencia negativa del sistema de ensayo por los pacientes, a modo de ejemplo, debida a la liberación de un volumen de muestra demasiado reducido, mediante el indicador de volumen, a través de lo cual se puede optimizar en último término la sensibilidad, especificidad y fiabilidad total.

De modo especialmente preferente, en el caso del indicador de volumen se trata de un indicador de color, que varía su color en el caso de contacto con un volumen de muestra suficiente, a modo de ejemplo en el caso de contacto con un volumen suficiente de fluido corporal, y en este sentido correlaciona con el volumen de muestra necesario para la determinación del analito. Como indicador de color se puede emplear cualquier indicador de color conocido por el especialista y que parezca apropiado para los fines de la presente invención, en tanto cumpla los criterios citados anteriormente y además no sea tóxico. Los ejemplos de tales indicadores de color comprenden en especial indicadores de color de pH o colorantes vegetales comunes, que se pueden aplicar sobre el elemento de extracción de muestras, a modo de ejemplo, mediante vaporización, estampado, pulverización y/o impregnación de este último.

En el siguiente paso del procedimiento según la invención, el elemento de extracción de muestras humectado con la muestra de analito se introduce en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico, que está configurado preferentemente como cámara (fig. 1A). El elemento de extracción de muestras, así como la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico configurada para el alojamiento, o bien integración del elemento de extracción de muestra, están configuradas en este caso de modo que la primera zona se cierre herméticamente tras introducción del elemento de extracción de muestras, y no pueda tener lugar ningún tipo de comunicación fluida entre el interior de la primera zona y el entorno exterior.

Después de haber alojado el elemento de extracción de muestras en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico, y de asegurar la hermeticidad de la primera zona frente al entorno exterior, se introduce agente eluyente en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico (fig. 1B), eluyéndose el analito a partir del elemento de extracción de muestras y distribuyéndose preferentemente de manera homogénea en el agente eluyente. En este aspecto, en una variante preferente la invención prevé que se ponga a disposición una mezcla homogénea de muestra, o bien analito, y agente eluyente, tras introducción de agente eluyente en la primera zona, lo que se puede asegurar, a modo de ejemplo, mediante un tramo mezclador microfluídico u otra estructura mezcladora microfluídica conocida por el especialista. Esto tiene la ventaja de que la muestra, antes de la puesta en contacto con un elemento de ensayo apropiado, se elabora adicionalmente, mediante lo cual el analito es accesible de manera más fácil y eficiente para un componente de enlace específico para el analito, y se minimizan oscilaciones, en especial en la determinación de muestras biológicas.

En el caso de empleo de una combinación apropiada de elemento de extracción de muestras y agente eluyente, por medio del anterior control de procedimiento se puede asegurar que la muestra y el analito contenido en la misma se eluya de modo esencialmente cuantitativo, es decir, en una cantidad de  $\geq 95$  % en peso, referido al peso total de la muestra absorbida, a partir del elemento de extracción de muestras, que el analito se desprenda de la matriz de muestra de modo esencialmente cuantitativo, y que se efectúe un mezclado completo de analito y agente eluyente. Un desprendimiento cuantitativo de la muestra a partir del elemento de extracción de muestras, así como un desprendimiento cuantitativo del analito a partir de la matriz de muestra es de significado esencial para una sensibilidad máxima de sistemas de ensayo diagnósticos, ya que como muestras para la identificación, a modo de ejemplo, de drogas se emplean frecuentemente fluidos corporales, que contienen grandes cantidades de proteínas,

lípidos e hidratos de carbono, que pueden provocar por su parte consecuencias no deseadas en reacciones inmunoquímicas.

Según la invención, el agente eluyente se puede introducir en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico de manera arbitraria. De este modo, en una variante de la invención, el agente eluyente puede estar alojado en el elemento de extracción de muestras empleado según la invención. Con este fin, el elemento de extracción de muestras puede comprender, a modo de ejemplo, una ampolla que contiene el agente eluyente, que se abre en el caso de introducción del elemento de extracción de muestras en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico, y libera el agente eluyente. Alternativamente, el agente eluyente puede estar alojado en una cuarta zona del dispositivo de análisis microfluídico, que está en comunicación fluida con la primera zona, y desde la cual el agente eluyente, a modo de ejemplo a través de un paso de manejo del usuario a realizar por separado, se puede lavar en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico (fig. 1A y 1B).

Como agente eluyente, en el ámbito de la presente invención se puede emplear en principio cualquier agente eluyente, que sea capaz de desprender el analito del elemento de extracción de muestras. Sin embargo, en el procedimiento aquí descrito se aplican preferentemente disoluciones tampón acuosas, que pueden comprender, en caso dado, otros reactivos, en especial al menos una proteína, al menos un hidrato de carbono, al menos un alcohol sacárico, al menos un detergente y/o al menos un disolvente orgánico, como se describen anteriormente en cada caso, de modo habitual en una concentración de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 1,5 % en peso. En el ámbito del procedimiento según la invención se considera especialmente preferente un agente eluyente, preferentemente acuoso, que comprende 1-propanosulfonato de 3-[3-colamidopropil]dimetil-amonio] como componente. Mediante combinación apropiada de los anteriores reactivos, en dependencia de la estructura del respectivo analito se pueden conseguir efectos sinérgicos, mediante lo cual se mejora la elución del analito del elemento de extracción de muestras, o bien el desprendimiento del analito de la matriz de muestra, y de este modo se puede ocasionar un aumento de la sensibilidad y/o especificidad de la determinación de analito.

A continuación de la elución del analito a partir del elemento de extracción de muestras, el eluato obtenido, es decir, en un paso adicional del procedimiento según la invención, la mezcla de muestra que contiene analito y agente eluyente se transfiere a la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico a través de medios apropiados, en especial a través de una estructura microfluídica, como por ejemplo un microcanal, y se pone en contacto con un componente de enlace específico para el analito alojado en la segunda zona durante un intervalo de tiempo definido, efectuándose un enlace del analito al componente de enlace específico para el analito. Por consiguiente, según la invención, el analito se incuba con el componente de enlace específico para el analítico en ausencia de un elemento de ensayo útil para la identificación del analito, mediante lo cual se puede aumentar significativamente la sensibilidad, así como la especificidad del procedimiento de identificación, en especial en la determinación de analitos poco hidrosolubles.

El paso del eluato de la primera zona a la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico se puede poner en marcha en este caso, a modo de ejemplo, mediante un paso de manejo del usuario a efectuar por separado, transportándose preferentemente un volumen definido de eluato a la segunda zona. El paso del eluato de la primera zona a la segunda zona se puede utilizar además para conseguir un grado aún más elevado de mezclado homogéneo de tramo mezclador microfluídico, u otra estructura microfluídica conocida por el especialista.

La segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico puede estar configurada en principio en cualquier forma, en tanto pueda alojar el eluato transportado de la primera zona, y posibilite un contacto del eluato con el componente de enlace específico para el analito dispuesto en la segunda zona. En una variante preferente de la invención, la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico está configurado como cámara aislada, y contiene un componente de enlace específico para el analito aislado. Alternativamente, la segunda zona puede comprender también varias cámaras, a modo de ejemplo 2 a 5 cámaras, que presentan preferentemente disposición paralela entre sí, y que pueden contener, en caso dado, diferentes componentes de enlace específicos para el analito, en tanto se deban determinar simultáneamente varios analitos (fig. 1C).

El componente de enlace específico para el analito puede ser cualquier sustancia química que se una a los analitos a analizar, pero que no forme ningún tipo de enlace con otras sustancias, eventualmente presentes en la muestra. Las sustancias químicas que cumplen este perfil de requisitos son generalmente conocidas por el especialista, o se pueden obtener correspondientemente a los requisitos en el respectivo analito por medio de experimentos rutinarios, o bajo aplicación de técnicas conocidas.

En en caso del componente de enlace específico para el analito se trata preferentemente de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo funcional, que puede presentar, en caso dado, adicionalmente un punto de enlace o varios puntos de enlace para un reactivo de captura, como se describe anteriormente. El concepto „fragmento de anticuerpo funcional“, como se emplea en el ámbito de la presente solicitud, designa en este caso un fragmento de anticuerpo que puede cumplir la función de un enlace específico en los analitos concebida para el mismo. Por el contrario, un „fragmento de anticuerpo no funcional“ designa un fragmento de anticuerpo que no forma ningún

enlace o ningún enlace específico con el analito, y en este aspecto no cumple la función de un enlace específico en los analitos concebida para el mismo.

5 Para facilitar la identificación del analito, el componente de enlace específico para el analito puede comprender, en caso dado, un marcaje detectable, como por ejemplo un marcaje enzimático, un marcaje de colorante, un marcaje fluorescente, un marcaje metálico o un marcaje de partículas. Para los fines de la presente invención se ha mostrado ventajoso el empleo de componentes de enlace específicos para el analito, que comprenden un marcaje detectable ópticamente, en especial un marcaje metálico. En el caso del marcaje se trata de modo especialmente preferente de un marcaje de oro, que posee la ventaja de que el resultado de ensayo se puede registrar de manera óptica-visual y valorar directamente por el usuario. Las técnicas por medio de las cuales se pueden introducir marcajes descritos anteriormente en una molécula a marcar, son conocidas por el especialista y en este aspecto no se explican más detalladamente.

15 Según la invención, la segunda zona puede contener el componente de enlace específico para el analito en cualquier forma, mientras que en el caso de entrada del eluato en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico se pueda efectuar una reacción con el componente de enlace específico para el analito. El componente de enlace específico para el analito en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico está alojado en el mismo preferentemente de tal manera que, en el caso de introducción de eluato en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico, se disuelve y se distribuye en la disolución de manera homogénea. Con este fin, el dispositivo de análisis microfluídico puede contener el componente de enlace, a modo de ejemplo, en forma desecada, entrando en consideración en principio también otras formas de almacenaje que parezcan apropiadas al especialista.

20 Tras puesta en contacto, y en caso dado mezclado homogéneo de eluato y componente de enlace específico para el analito, se pone en marcha habitualmente una reacción inmunológica, formándose un complejo antígeno-anticuerpo a partir de moléculas de analito y componente de enlace específico para el analito, en caso dado marcado. Para el mantenimiento de una sensibilidad y especificidad elevadas, el eluato se pone en contacto con el analito contenido en el mismo durante un intervalo de tiempo de al menos 3 segundos, preferentemente de al menos 5 segundos, con el componente de enlace específico para el analito, efectuándose un enlace del analito al componente de enlace específico para el analito. En este contexto se ha mostrado ventajoso un tiempo de reacción de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 600 segundos, de modo más preferente de aproximadamente 60 segundos a aproximadamente 300 segundos, del modo más preferente de aproximadamente 90 segundos a aproximadamente 240 segundos.

25 La reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito se puede efectuar en principio de manera arbitraria, en tanto se garantice un contacto suficiente entre el analito y el componente de enlace específico para el analito. No obstante, para los fines de la presente invención se ha mostrado ventajoso llevar a cabo la reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito en fase estacionaria, de modo que se disponga de un tiempo de contacto suficientemente largo para la formación de un complejo constituido por analito y componente de enlace específico para el analito.

30 Para favorecer la reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito, la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico puede comprender otros reactivos en caso necesario. En este contexto se consideran ventajosos en especial reactivos que fomentan una disolución del componente de enlace específico para el analito en el caso de contacto con el eluato, favorecen un mezclado completo de eluato y componente de enlace específico para el analito, o bien aseguran una reacción óptima entre el analito y el componente de enlace específico para el analito. Los reactivos que se pueden emplear con este fin comprenden, a modo de ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, alcoholes sacáricos, detergentes o/y sales, como se definen anteriormente.

35 Para favorecer la reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito, la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico puede comprender otros reactivos en caso necesario. En este contexto se consideran ventajosos en especial reactivos que fomentan una disolución del componente de enlace específico para el analito en el caso de contacto con el eluato, favorecen un mezclado completo de eluato y componente de enlace específico para el analito, o bien aseguran una reacción óptima entre el analito y el componente de enlace específico para el analito. Los reactivos que se pueden emplear con este fin comprenden, a modo de ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, alcoholes sacáricos, detergentes o/y sales, como se definen anteriormente.

40 En otro paso del procedimiento según la invención, la mezcla de reacción obtenida en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico, es decir, la mezcla de muestra que contiene analito, agente eluyente y componente de enlace específico para el analito, se transfiere a la tercera zona del dispositivo de análisis microfluídico a través de medios apropiados, como por ejemplo un microcanal, y se pone en contacto en ésta con al menos un elemento de ensayo, sobre el cual se puede efectuar una determinación subsiguiente del analito (fig. 1D). El paso de la mezcla de reacción de la segunda zona a la tercera zona se puede poner en marcha, a modo de ejemplo, mediante un paso de manejo del usuario a efectuar por separado, a modo de ejemplo mediante apertura de un microcanal, transfiriéndose preferentemente un volumen definido de mezcla a transportar a la tercera zona del dispositivo de análisis microfluídico y llegando éste a al menos un elemento de ensayo, a modo de ejemplo bajo utilización de efectos capilares. En una variante preferente de la invención, la tercera zona comprende más de un elemento de ensayo, a modo de ejemplo 2 a 5 elementos de ensayo, que presentan preferentemente disposición paralela entre sí.

45 Los elementos de ensayo empleados según la invención comprenden en principio cualquier forma física de uso común para el especialista, que sea apropiada para la determinación de la presencia y/o de la cantidad de un analito

5 en una muestra. En este caso, el elemento de ensayo está configurado preferentemente de modo que, en el caso de presencia del analito a determinar, genere una señal detectable ópticamente, que posibilita una determinación cualitativa y/o cuantitativa del analito. Los ejemplos de elementos de ensayo en el sentido de la presente invención comprenden, entre otras, tiras de ensayo, bandas de ensayo y paneles de ensayo, sobre las que se puede aplicar el analito, a modo de ejemplo en forma de una disolución acuosa o no acuosa.

10 En el caso del elemento de ensayo se trata preferentemente de una tira de ensayo cromatográfica, que puede estar formada por un único material apto para cromatografía, en caso dado en forma de tiras, en una variante de la invención. Sin embargo, la tira de ensayo cromatográfica comprende preferentemente varias superficies con actividad capilar dispuestas de manera solapante sobre una capa soporte, constituidas por materiales cromatográficos iguales o diferentes, que están en comunicación fluida entre sí, y forman de este modo un tramo de transporte, a lo largo de las cuales puede circular un fluido, movido por fuerzas capilares, a través de todas las zonas del elemento de ensayo. En este caso, como material cromatográfico se puede emplear cualquier material absorbente de líquido, poroso o capilar conocido, como por ejemplo celulosa y derivados de la misma, fibras de vidrio, así como vellones y tejidos constituidos por materiales sintéticos o naturales. Las tiras de ensayo cromatográficas, que se pueden aplicar en el ámbito de la presente invención, se describen, a modo de ejemplo, en el documento EP 0 699 906 A2, a cuya manifestación se hace referencia expresamente en este caso.

20 Para posibilitar una determinación del analito, a modo de ejemplo a base de un formato de ensayo competitivo o un formato de ensayo tipo sandwich, los elementos de ensayo pueden comprender varias zonas limitables espacialmente entre sí, que cumplen preferentemente una función diferente y, en tanto sea necesario, están dotadas de diversos reactivos. En el ámbito del procedimiento según la invención es especialmente preferente el empleo de un elemento de ensayo que comprende (a) una primera zona, que está configurada para el alojamiento de un agente eluyente, (b) una segunda zona que comprende una sustancia de control marcada, (c) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica del analito, y (d) una cuarta zona, que está configurada para el alojamiento de agente eluyente excedente.

25 El elemento de ensayo comprende preferentemente una zona terminal, que está configurada para el alojamiento de agente eluyente, y comprende habitualmente un material absorbente, como por ejemplo tejido o/y vellón. Tras humectación de esta zona con agente eluyente, en cuyo caso, en el ámbito del procedimiento según la invención, se trata de la mezcla de reacción obtenida en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico, constituida por muestra que contiene analito, agente eluyente y componente de enlace específico para el analito, el agente eluyente migra a través de las diferentes zonas del elemento de ensayo. En este caso se puede utilizar ventajosamente la acción capilar de los componentes aislados del elemento de ensayo, que están dispuestos, o bien unidos entre sí de tal manera que se garantiza un flujo de agente eluyente ininterrumpido.

35 La zona configurada para la detección óptica del analito comprende habitualmente varias secciones definidas, en las que se pueden inmovilizar diferentes reactivos. En este aspecto, esta zona comprende preferentemente (a) una sección que está configurada para la unión de componente de enlace específico para analito no enlazado, (b) una sección que está configurada para la unión del complejo constituido por analito y componente de enlace específico para el analito, y (c) una sección en la que se genera una señal de control independientemente del analito. En este caso, la zona configurada para la detección óptica del analito puede estar formada por uno o varios materiales, que parezcan apropiados al especialista para los fines de la invención, como por ejemplo membranas de Nylon®, nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno.

45 La sección prevista para la unión del componente de enlace específico para el analito no enlazado puede comprender, a modo de ejemplo, análogos de analito inmovilizados, en especial polihaftenos, que capturan el componente de enlace específico para el analito, en caso dado marcado, a consecuencia de la formación de un complejo, en una posición definida en el elemento de ensayo (línea de intercepción), y de este modo evitan la generación de resultados falsos positivos. El complejo constituido por analito y componente de enlace específico para el analito no se inmoviliza habitualmente en la línea de intercepción, ya que el analito bloquea los puntos de unión necesarios a tal efecto en el componente de enlace específico para el analito.

50 La sección configurada para la formación del complejo constituido por analito y componente de enlace específico para analito comprende preferentemente un componente de enlace específico para el componente de enlace específico para el analito, que ocasiona una inmovilización del complejo constituido por analito y componente de enlace específico para el analito en una posición predeterminada en el elemento de ensayo (línea de ensayo), y de este modo posibilita una determinación óptica del analito. La inmovilización del complejo se efectúa por regla general a través de un punto de enlace libre del componente de enlace específico para el analito, acompañando una coloración de la línea de ensayo una identificación positiva de analito.

55 Para poder leer claramente la señal en la línea de ensayo y excluir confusiones con la línea de intercepción, la línea de intercepción se puede cubrir, en caso dado de modo apropiado. La sección de control comprende preferentemente un componente de enlace apropiado para la sustancia de control de la segunda zona del elemento

de ensayo en forma inmovilizada, mediante lo cual la substancia de control se inmoviliza en el caso de contacto con su componente de enlace, y en una posición predeterminada en el elemento de ensayo (línea de control) se genera una señal detectable. La línea de control se configura independientemente de la presencia de analito, y actúa como indicador para una funcionalidad inmejorable del elemento de ensayo. Agente eluyente excedente, que abandona la zona del elemento de ensayo configurada para la detección óptica del analito, se puede absorber en una zona del elemento de ensayo configurada a propósito a tal efecto con ayuda de un material absorbente de líquido.

La determinación de analito cualitativa y/o cuantitativa llevada a cabo en el último paso del procedimiento según la invención se puede efectuar de manera arbitraria. A tal efecto se pueden emplear en principio todos los métodos para la identificación de reacciones inmunológicas conocidos por el estado de la técnica, que generan una señal mensurable, que se puede valorar, o bien leer manualmente o bajo empleo de medios apropiados. En el ámbito de la presente invención se emplean preferentemente métodos de identificación ópticos, en especial métodos de identificación fotométricos o fluorimétricos. Según la invención es especialmente preferente una identificación óptica-visual de analito.

En una variante preferente del procedimiento según la invención, el dispositivo de análisis microfluídico comprende, además de las zonas citadas anteriormente, otra zona que comprende al menos una función de cronómetro para el control temporal de los procesos, o bien reacciones, que se desarrollan en el dispositivo de análisis. El concepto „función de cronómetro“, como se emplea en el ámbito de la presente invención, designa un cronómetro que indica al usuario, a modo de ejemplo mediante una señal óptica y/o acústica, el final de un proceso que se desarrolla en el dispositivo de análisis, en especial el final de una reacción que se desarrolla en el dispositivo de análisis, y en caso necesario puede hacer necesario otro paso de manejo del usuario, como por ejemplo el apretar un botón en el dispositivo de análisis para la lectura del resultado de ensayo.

Por medio del cronómetro citado anteriormente se controla de modo especialmente preferente el tiempo de reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico [paso (d)] o/y el tiempo de determinación de analito en el elemento de ensayo en la tercera zona del dispositivo de análisis microfluídico [paso (f)], previendo el dispositivo de análisis microfluídico para cada uno de ambos pasos preferentemente un cronómetro propio, y comprendiendo en este sentido dos cronómetros independientes entre sí.

En lo que se refiere al paso (d) del procedimiento según la invención, el cronómetro se pone en funcionamiento habitualmente en el caso de introducción del eluato, es decir, de la mezcla de muestra que contiene analito y agente eluyente, en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico. Este primer cronómetro indica al usuario que la reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito ha concluido, y con ello que se puede iniciar el paso de la mezcla de la segunda a la tercera zona del dispositivo de análisis microfluídico.

En relación con el paso (f), el cronómetro se pone en funcionamiento habitualmente con el paso de la mezcla de reacción, constituida por muestra analítica, agente eluyente y componente de enlace específico para el analito, a la tercera zona del dispositivo de análisis microfluídico. Este segundo cronómetro está ajustado de modo que correlaciona con el tiempo de determinación analítica en el elemento de ensayo, e indica al usuario que puede leer el resultado del ensayo. En este sentido se pueden evitar resultados de ensayo falsos debidos a lectura prematura del elemento de ensayo, así como retrasos innecesarios en la valoración debidos a tiempo de espera demasiado largos.

Un cronómetro definido y constante se puede representar, entre otras, mediante una cromatografía que se lleva a cabo junto con las reacciones que se desarrollan en el paso (d) y/o en el paso (f). A tal efecto se puede emplear, a modo de ejemplo, una tira de ensayo de flujo lateral, que está constituida por una o varias superficies con actividad capilar dispuestas en yuxtaposición, que están en comunicación fluida, y posibilitan un transporte de líquido continuo. En una variante preferente, la tira de ensayo comprende al menos un colorante como indicador óptico, que puede estar aplicado en diversas posiciones en la banda de ensayo y, debido a la dependencia del tiempo de cromatografía del agente eluyente, tras un intervalo de tiempo definido, a modo de ejemplo mediante modificación de color y/o mediante aparición en una ventana de lectura.

En tanto el dispositivo de análisis microfluídico comprenda un cronómetro para el control temporal de las reacciones que se desarrollan en el dispositivo de análisis, de modo preferente éste contiene adicionalmente medios para la iniciación, o bien actuación del cronómetro, como por ejemplo al menos un agente eluyente apropiado para aplicaciones cromatográficas. Estos medios para la iniciación, o bien actuación del cronómetro, pueden estar alojados en una de las zonas del dispositivo de análisis microfluídico descritas anteriormente, o bien en otra zona, separada de las mismas, considerándose preferente la última variante. Los acondicionamientos alternativos del dispositivo de análisis microfluídico, o bien sus zonas aisladas, surgen para el especialista basándose en su conocimiento general, en combinación con las anteriores explicaciones.

El procedimiento según la invención posibilita la determinación de uno o varios analitos con sensibilidad y

especificidad elevadas. De este modo, según la invención es preferente determinar analitos con una especificidad de al menos un 95 % o/y una sensibilidad de al menos un 90 %. De modo más preferente, la determinación se efectúa con una especificidad de al menos un 98 % o/y una sensibilidad de al menos un 95 %, de modo que por medio del procedimiento descrito en este caso se puede identificar hasta un límite de identificación inferior de aproximadamente 1 ng/ml.

El procedimiento según la invención se puede emplear para la determinación de cualquier sustancia biológica o química que sea identificable por vía inmunológica. En este caso, el procedimiento aquí descrito se emplea preferentemente para la identificación de un analito seleccionado a partir del grupo constituido por anfetaminas, metanfetaminas, cannabinoides, en especial  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, opiáceos, en especial morfina, codeína o dihidrocodeína, opioides, en especial heroína, alcaloides de tropano, en especial cocaína, o benzodiazepinas, siendo especialmente preferentes  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol y cocaína como analitos.

El analito puede proceder de cualquier fuente, como por ejemplo de una superficie de un objeto humectado con el analito, o de un fluido corporal, como por ejemplo sangre total, plasma, suero, orina, saliva o sudor. Por medio del procedimiento aquí descrito se determina preferentemente la presencia o/y la cantidad de un analito en una muestra de sangre total, orina o saliva. La cantidad de muestra requerida para la puesta en práctica del procedimiento asciende de modo habitual de aproximadamente 5  $\mu$ l a aproximadamente 500  $\mu$ l, de modo preferente de aproximadamente 10  $\mu$ l a aproximadamente 250  $\mu$ l, y del modo más preferente de aproximadamente 30  $\mu$ l a aproximadamente 150  $\mu$ l.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que se emplea preferentemente para la puesta en práctica del procedimiento descrito anteriormente, y comprende los siguientes componentes:

- (a) un dispositivo de análisis microfluídico para la determinación de un analito, que comprende:
  - (i) una primera zona que está configurada para la introducción de un elemento de extracción de muestras con analito absorbido en el mismo, y para la elución del analito del elemento de extracción de muestras,
  - (ii) una segunda zona, que contiene un componente de enlace específico para el analito, y que está unida a la primera zona mediante microcanales, etapas, ramificaciones o/y cámaras, no comprendiendo la segunda zona un elemento de ensayo útil para la identificación del analito,
  - (iii) una tercera zona, que comprende al menos un elemento de ensayo para la determinación de la presencia o/y de la cantidad de analito, y que está unida a la segunda zona mediante microcanales, etapas, ramificaciones o/y cámaras,
  - (iv) en caso dado una cuarta zona que comprende un agente eluyente para la elución del analito del elemento de extracción de muestras, y que presenta comunicación fluida con la primera zona,
  - (v) en caso dado una quinta zona que comprende al menos una función de cronómetro para el control temporal de las reacciones que se desarrollan en el dispositivo de análisis, y
  - (vi) en caso dado una carcasa, y
- (b) un elemento de extracción de muestras que se introduce en el dispositivo de análisis microfluídico, y comprende, en caso dado, un agente eluyente para la elución del analito del elemento de extracción de muestras.

En lo que a acondicionamientos preferentes del dispositivo de análisis microfluídico contenido en el anterior kit, del elemento de extracción de muestras, así como del elemento de ensayo, se remite a las explicaciones en relación con la descripción del procedimiento según la invención.

La invención se debe explicar más detalladamente por medio de las siguientes figuras y ejemplos.

#### Descripción de las figuras

Figura 1: representación de una forma de ejecución de un dispositivo de análisis microfluídico para la puesta en práctica del procedimiento según la presente invención, que comprende:

- (a) una primera cámara para la introducción de un elemento de extracción de muestras y para la elución de analito a partir del elemento de extracción de muestras,
- (b) cinco segundas cámaras que contienen un componente de enlace específico para el analito, y que presentan comunicación fluida con la primera cámara,
- (c) cinco tiras de ensayo para la determinación de la presencia o/y de la cantidad de analito, que presentan comunicación fluida respectivamente con una de las segundas cámaras,
- (d) una reserva con agente eluyente, que presenta comunicación fluida con la primera cámara, y
- (e) dos cronómetros para el control temporal de las reacciones que se desarrollan en el

dispositivo de análisis.

1A: introducción de un elemento de extracción de muestras en la primera cámara del dispositivo de análisis microfluídico,

5 1B: elución del analito a partir del elemento de extracción de muestras en la primera cámara por medio del agente eluyente contenido en la reserva,

1C: paso del eluato a la segunda cámara y puesta en contacto con el componente de enlace específico para el analito, o bien el componente de enlace específico para el analito,

1D: paso de la mezcla de reacción a la tira de ensayo y determinación del/de los analito(s).

10 Figura 2: sección transversal de una forma de ejecución de un elemento de ensayo para la puesta en práctica del procedimiento según la presente invención. El elemento de ensayo representado en forma de una tira de ensayo comprende:

(a) una primera zona que comprende una sustancia de control marcada, así como, en caso dado, otros reactivos,

15 (b) una segunda zona que está configurada para la detección óptica del analito, y comprende una línea de intercepción, una línea de ensayo y una línea de control, y

(c) una tercera zona que está configurada para el alojamiento de agente eluyente excedente.

Figura 3: dependencia de la sensibilidad de la determinación de  $\Delta^9$ -THC respecto al tiempo de reacción entre analito y componente de enlace específico para el analito.

20 Figura 4: representación de diversas tiras de ensayo con colorante aplicado sobre las mismas, que posibilitan la determinación de intervalos de tiempo definidos y constantes.

4A: tiras de ensayo con colorante inmovilizado, que modifica su color tras un intervalo de tiempo definido,

4B: tiras de ensayo con colorante, que aparece en una ventana de lectura tras un intervalo de tiempo definido.

## 25 Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de inmunógeno de  $\Delta^9$ -THC

30 Se diluyeron 1,25 ml de una disolución madre de ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico A (ácido 1-hidroxi-(6aR,10aR)-6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,10a-tetrahidrobenzo[c]cromen-2-carboxílico; firma Lipomed) en N,N-dimetilformamida (concentración: 100,8 mg/ml) con 8,75 ml de N,N-dimetilformamida a un volumen final de 10 ml (concentración final: 12,6 mg/ml).

35 A continuación se añadieron 5 ml de esta disolución diluida bajo agitación a una disolución acuosa de albúmina de suero vacuno (BSA), que se había obtenido previamente mediante disolución de 250 mg de albúmina de suero vacuno (firma Sigma Aldrich) en una mezcla de 25 ml de agua destilada y 2,5 ml de N,N-dimetilformamida. Tras adición de 6,3 ml de agua destilada a la mezcla de reacción obtenida se añadieron sucesivamente los restantes 5 ml de la disolución diluida de ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico A en N,N-dimetilformamida descrita anteriormente, otros 6 ml de agua destilada, así como 0,2 ml de una disolución de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (firma Sigma Aldrich) en N,N-dimetilformamida (concentración 500 mg/ml).

40 El vaso de precipitados con la disolución contenida en el mismo se envolvió en lámina de aluminio y se agitó en un agitador magnético durante 24 horas a 5°C. A continuación se transfirió la disolución a un depósito de diálisis y se dializó durante un intervalo de tiempo de 4 días a 5°C frente a una disolución al 25 % de N,N-dimetilformamida en agua. El producto de diálisis se sometió a ensayo por medio de inmunoelectroforesis. Incubación con un anticuerpo anti-BSA de cabra (firma Genetex), así como bandas de precipitado, muestran que el inmunógeno de  $\Delta^9$ -THC se diferencia de la banda de albúmina de suero vacuno.

45 Ejemplo 2: obtención de anticuerpos contra  $\Delta^9$ -THC

Se inmunizaron 20 ratones con el inmunógeno de  $\Delta^9$ -THC obtenido en el ejemplo 1 en adyuvante de Freund

completo (firma Sigma Aldrich), ascendiendo la dosis para la primera y para cada inmunización adicional a 75 µg de inmunógeno por animal en cada caso. Las inmunizaciones se efectuaron durante un intervalo de tiempo de 6 meses en un intervalo de un mes respectivamente.

- 5 Los sueros obtenidos a partir de los ratones inmunizados se analizaron a continuación en un ensayo en placas de microtitración para verificar la presencia de anticuerpos contra  $\Delta^9$ -THC. A tal efecto, las placas de microtitración revestidas con estreptavidina se incubaron en primer lugar con 10 ml de una disolución de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol-[N'-biotinilaminocaproil-(3,6-dioxa-8-aminoocil)-amida] en disolución acuosa tamponada con fosfato, que se había obtenido previamente mediante reacción de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinolsuccinimidiléster y N-(biotinilaminocaproil)-1,8-diamino-3,6-dioxaoctano (firma Applichem), y se incubó durante 12 h a 4°C.
- 10 Tras lavado con 20 ml de una disolución al 0,05 % de Tween 20 en disolución salina tamponada con fosfato se incubaron las placas de microtitración respectivamente durante 1 h a 20°C con 10 ml de sueros a analizar, y a continuación de nuevo con 20 ml de una disolución al 0,05 % de Tween 20 en disolución salina tamponada con fosfato. Para la detección se incubó durante 1 h a 20°C con 10 ml de una disolución de un conjugado de peroxidasa e IgG anti-ratón de conejo (firma Dako), se lavó con 20 ml de una disolución al 0,05 % de Tween 20 en disolución salina tamponada con fosfato, y se mezcló con sustrato. Se seleccionaron sueros con una buena afinidad frente a  $\Delta^9$ -THC para la obtención de anticuerpos contra  $\Delta^9$ -THC.
- 15

Ejemplo 3: obtención de un anticuerpo marcado con oro contra  $\Delta^9$ -THC

- 20 Se obtuvo sol de oro con un diámetro de partícula de 20 nm, determinado mediante espectroscopía de correlación de fotones, en ajuste al estado de la técnica (Frens, Nature (1973), 241, 20-22). El marcaje del anticuerpo específico para  $\Delta^9$ -THC obtenido en el ejemplo 2 con las partículas de oro se efectuó coincidiendo con procedimientos conocidos (Geoghegan et al., J. Immunol. Meth. (1980), 34, 11-31).

Ejemplo 4: influencia de 3-[3-(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) sobre la sensibilidad en el agente eluyente

- 25 Se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de  $\Delta^9$ -THC diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de  $\Delta^9$ -THC de 50 ng/ml. Acto seguido se extrajeron 100 µl de esta saliva de zona de almacenamiento dotada con un elemento de extracción de muestras comercial (firma CopanFlock Technologies), y el elemento de extracción de muestras se introdujo en la primera cámara de un dispositivo de análisis microfluídico, como se representa en la fig. 1.

- 30 A continuación se mezcló el elemento de extracción de muestras en la primera cámara del dispositivo de análisis microfluídico durante 20 segundos con cuatro disoluciones de 3-[3-(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato de concentraciones diferentes (firma Sigma Aldrich) en agua destilada, eluyéndose la muestra del elemento de extracción de muestras que contiene analito, y distribuyéndose de manera homogénea en el agente eluyente.

- 35 La mezcla de muestra que contiene analito y agente eluyente se transfirió acto seguido a través de un sistema capilar microfluídico a una segunda cámara del dispositivo de análisis microfluídico, que contenía un anticuerpo específico para  $\Delta^9$ -THC según el ejemplo 3, y se puso en contacto con el componente de enlace específico para el analito en estado estacionario durante un intervalo de tiempo de 120 a 180 segundos.

- 40 La geometría de la segunda cámara, con una longitud de 3,2 cm, una anchura de 1 cm, y una altura de 2,1 mm, estaba diseñada de tal manera que se obtuvo una gran superficie de difusión entre el eluato y el componente de enlace específico para el analito presente en la superficie de fondo de la cámara en forma desecada (disolución desecada del anticuerpo específico para  $\Delta^9$ -THC en tampón carbonato 50 mM, pH 6). Las investigaciones microscópicas mostraron que, tras incubación de la muestra que contiene analito con el componente de enlace específico para el analito no se presentaban residuos de componente de enlace específico para el analito desecado en la segunda cámara.

- 45 Una vez concluida la fase estacionaria se transfirió la mezcla de reacción a una tira de ensayo a través de un sistema capilar microfluídico, y de este modo se inició el proceso de cromatografía. El desarrollo del ensayo completo duró 5 a 10 minutos. Los resultados de las cuatro determinaciones se representan en la tabla 1:

Tabla 1

Concentración de CHAPS en el agente eluyente (% en peso)	0%	0.01%	0.1%	1.0%
Intensidad de señal para $\Delta^9$ -THC	0	1	6	3

5 Como se desprende de la tabla 1, la elución con disoluciones de CHAPS de diferente concentración en agua conduce a un desarrollo de señal diferente en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica. La escala de intensidad de señal comprende 9 unidades, considerándose negativas las señales en el intervalo de 0-3, ligeramente positivas las señales en el intervalo de 4-5, y positivas las señales en el intervalo de > 6. En particular se muestra que se produce un aumento de la sensibilidad de la determinación de analito a partir de una concentración de un 0,01 % en peso de CHAPS en el agente eluyente. La mejor sensibilidad se puede conseguir con una concentración de un 0,1 % en peso de CHAPS en el agente eluyente.

Ejemplo 5: influencia del entremezclado de analito y agente eluyente sobre la sensibilidad

10 Se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de  $\Delta^9$ -THC diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de  $\Delta^9$ -THC de 200 ng/ml. Acto seguido se extrajeron 300  $\mu$ l de esta saliva de zona de almacenamiento dotada con un elemento de extracción de muestras comercial (firma CopanFlock Technologies), y el elemento de extracción de muestras se introdujo en la primera cámara de un dispositivo de análisis microfluídico, como se representa en la fig. 1.

15 A continuación se mezcló el elemento de extracción de muestras en la primera cámara del dispositivo de análisis microfluídico durante 40 segundos con 900  $\mu$ l de agente eluyente (25 mM Tris con 0,5 % de colato), eluyéndose la muestra del elemento de extracción de muestras que contiene analito. A continuación se formó una mezcla homogénea de muestra que contiene analito y agente eluyente en la primera cámara, bajo empleo de una estructura de mezclado microfluídica; en un ensayo comparativo se prescindió de una distribución homogénea de analito en el agente eluyente.

20 La mezcla de muestra que contiene analito y agente eluyente se transfirió acto seguido a una segunda cámara, que contenía un anticuerpo específico para  $\Delta^9$ -THC según el ejemplo 3, y se puso en contacto con el componente de enlace específico para el analito en estado estacionario durante un intervalo de tiempo de 120 a 180 segundos.

25 La geometría de la segunda cámara, con una longitud de 3,2 cm, una anchura de 1 cm, y una altura de 2,1 mm, estaba diseñada de tal manera que se obtuvo una gran superficie de difusión entre el eluato y el componente de enlace específico para el analito presente en la superficie de fondo de la cámara en forma desecada (disolución desecada del anticuerpo específico para  $\Delta^9$ -THC en tampón carbonato 50 mM, pH 6). Las investigaciones microscópicas mostraron que, tras incubación de la muestra que contiene analito con el componente de enlace específico para el analito no se presentaban residuos de componente de enlace específico para el analito desecado en la segunda cámara.

30 Una vez concluida la fase estacionaria se transfirió la mezcla de reacción a una tira de ensayo a través de un sistema capilar microfluídico, y de este modo se inició el proceso de cromatografía. El desarrollo del ensayo completo duró 5 a 10 minutos. En este caso se mostró que el diferente entremezclado de muestra que contiene analito y agente eluyente en la primera cámara del dispositivo de análisis microfluídico conduce a un desarrollo de señal de diferente intensidad en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica.

35 La escala de intensidad de señal comprende 9 unidades, considerándose negativas las señales en el intervalo de 0-3, ligeramente positivas las señales en el intervalo de 4-5, y positivas las señales en el intervalo de > 6. La carga con la mezcla homogénea de muestra que contiene analito y agente eluyente mostraba una intensidad de señal de siete unidades, mientras que la carga comparativa no entremezclada dió por resultado una intensidad de señal significativamente más débil, únicamente de dos unidades.

Ejemplo 6: influencia del tiempo de incubación de analito y componente de enlace específico para el analito sobre la sensibilidad

45 Se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de  $\Delta^9$ -THC diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de  $\Delta^9$ -THC de 50 ng/ml. Acto seguido se extrajeron 100  $\mu$ l de esta saliva de zona de almacenamiento dotada con un elemento de extracción de muestras comercial (firma CopanFlock Technologies), y el elemento de extracción de muestras se introdujo en la primera cámara de un dispositivo de análisis microfluídico, como se representa en la fig. 1.

50 A continuación se mezcló el elemento de extracción de muestras en la primera cámara del dispositivo de análisis microfluídico durante 20 segundos con agente eluyente (agua destilada), eluyéndose la muestra que contiene analito del primer elemento de extracción de muestras y distribuyéndose de manera homogénea en el agente eluyente.

La mezcla de muestra que contiene analito y agente eluyente se transfirió acto seguido a una segunda cámara del dispositivo de análisis microfluídico, que contenía un anticuerpo específico para  $\Delta^9$ -THC según el ejemplo 3, a través de un sistema capilar microfluídico, y se puso en contacto con el componente de enlace específico para el analito en estado estacionario durante diferentes intervalos de tiempo (tiempo de incubación).

- 5 La geometría de la segunda cámara, con una longitud de 3,2 cm, una anchura de 1 cm, y una altura de 2,1 mm, estaba diseñada de tal manera que se obtuvo una gran superficie de difusión entre el eluato y el componente de enlace específico para el analito presente en la superficie de fondo de la cámara en forma desecada (disolución desecada del anticuerpo específico para  $\Delta^9$ -THC en tampón carbonato 50 mM, pH 6). Las investigaciones microscópicas mostraron que, tras incubación de la muestra que contiene analito con el componente de enlace específico para el analito no se presentaban residuos de componente de enlace específico para el analito desecado en la segunda cámara.

- 15 Una vez concluida la fase estacionaria se transfirió la mezcla de reacción a una tira de ensayo a través de un sistema capilar microfluídico, y de este modo se inició el proceso de cromatografía. El desarrollo del ensayo completo duró 5 a 10 minutos. Los resultados de las cuatro determinaciones, que se pueden efectuar visualmente o bajo empleo de un correspondiente aparato de lectura, se representan en la figura 3.

- 20 Como se desprende de la figura 3, diferentes tiempos de incubación en la segunda cámara del dispositivo de análisis microfluídico conducen a un desarrollo de señal de diferente intensidad en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica. La escala de intensidad de señal (eje y) comprende 9 unidades, considerándose negativas las señales en el intervalo de 0-3, ligeramente positivas las señales en el intervalo de 4-5, y positivas las señales en el intervalo de > 6. El tiempo de incubación (eje x) se indica en minutos. Se muestra que se puede aumentar claramente la sensibilidad, y se alcanza un óptimo en aproximadamente 3 minutos, mediante ajuste de un tiempo de incubación de 2 minutos.

Ejemplo 7: puesta a disposición de funciones de cronómetro definidas y constantes

- 25 Para la puesta a disposición un dispositivo de análisis microfluídico con funciones de cronómetro definidas y constantes se disolvió el indicador de pH azul de bromotimol (firma Sigma) en tampón citrato 1 mM, pH 5,0 (firma Sigma), y se ajustó a una concentración de 1 mg/ml. Esta disolución se aplicó a continuación a una tira de ensayo cromatográfica en una posición determinada previamente. Mediante aplicación de 20 mM Tris-tampón, pH 8,5 (firma Sigma) en un extremo de la tira de ensayo se inició la cromatografía.

- 30 Una vez transcurrido un intervalo de tiempo definido, el agente eluyente alcanzó la zona de la tira de ensayo marcada con azul de bromotimol, modificándose el color del indicador de pH de amarillo a azul. El viraje de color indica al usuario el final de un intervalo de tiempo definido, que es dependiente del posicionado previo de la disolución de colorante en la tira de ensayo. La figura 4A muestra tres tiras de ensayo, que definen un intervalo de tiempo de 1 minuto, 2 minutos, o bien 3 minutos, debido a diferente posicionado de la disolución de colorante.

- 35 En una variante se empleó como colorante azul de metilo (firma Sigma), que se elaboró en proporción 1 : 10 en agua destilada. Esta disolución se aplicó a continuación sobre una tira de ensayo cromatográfica en una posición predeterminada. Mediante aplicación de agua destilada en un extremo de la tira de ensayo se inició la cromatografía.

- 40 Tras un cierto tiempo, el agente eluyente alcanzó la zona de la tira de ensayo marcada con azul de metilo, transportándose concomitantemente el colorante por el agente eluyente, y moviéndose hasta una ventana de lectura. La ventana de lectura indica al usuario el final de un intervalo de tiempo definido, que es dependiente del posicionado de la ventana de lectura en una tira de ensayo. La figura 4B muestra tal tira de ensayo antes del inicio de la cromatografía (1), o bien tras un tiempo de cromatografía de aproximadamente 8 minutos (2).

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para la determinación de un analito, que comprende los pasos:
- 5 (a) puesta a disposición de un dispositivo de análisis microfluídico, que comprende al menos una primera, una segunda y una tercera zona, estando unida la primera zona con la segunda zona y la segunda zona con la tercera zona por medio de microcanales, etapas, ramificaciones y/o cámaras,
  - (b) toma de una muestra que contiene el analito de una superficie de muestra con un elemento de extracción de muestras,
  - (c) introducción del elemento de extracción de muestras en la primera zona del dispositivo de análisis microfluídico, y elución del analito en la primera zona con un agente eluyente,
  - 10 (d) transferencia del eluato obtenido en el paso (c) a la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico y puesta en contacto del eluato con un componente de enlace específico para el analito alojado en la segunda zona durante un intervalo de tiempo de al menos 3 segundos en ausencia de un elemento de ensayo útil para la identificación del analito, efectuándose un enlace del analito en el componente de enlace específico para el analito,
  - 15 (e) transferencia de la mezcla obtenida en el paso (d) a la tercera zona del dispositivo de análisis microfluídico, y puesta en contacto de la mezcla con al menos un elemento de ensayo alojado en la tercera zona, útil para la determinación del analito, y
  - (f) determinación de la presencia y/o de la cantidad de analito en el elemento de ensayo.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que se emplea un elemento de extracción de muestras que comprende un indicador de volumen, mostrando el indicador de volumen al usuario si se tomó un volumen de muestra suficiente para la determinación del analito.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el agente eluyente se aloja en el elemento de extracción de muestras o/y en una cuarta zona de la instalación de análisis microfluídica.
- 25 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se emplea un agente eluyente que comprende
- (a) una disolución tampón acuosa, y
  - (b) en caso dado una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono, un alcohol sacárico, un detergente y/o un disolvente orgánico.
- 30 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que se emplea como componente de enlace específico para el analito un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo funcional, y comprende, en caso dado, un marcaje detectable ópticamente, en especial un marcaje metálico.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el componente de enlace específico para el analito se disuelve en el caso de introducción de eluato obtenido en el paso (c) en la segunda zona del dispositivo de análisis microfluídico, y se distribuye en la disolución de manera homogénea.
- 35 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito en el paso (d) se lleva a cabo durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 5 segundos hasta aproximadamente 600 segundos, en especial de aproximadamente 90 segundos hasta aproximadamente 240 segundos.
- 40 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la reacción entre el analito y el componente de enlace específico para el analito en el paso (d) se lleva a cabo en fase estacionaria.
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que como elemento de ensayo se emplea una tira de ensayo cromatográfica.
- 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la determinación del analito en el paso (f) se efectúa de manera óptica, en especial óptica-visual.
- 45 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que la duración del paso (d) y/o del paso (f) se controla a través de al menos un cronómetro integrado en el dispositivo de análisis microfluídico, en especial dos cronómetros integrados en el dispositivo de análisis microfluídico.
- 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que como analito se emplea una anfetamina, una metanfetamina, un cannabinoide, en especial  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, un opiáceo, en

especial morfina, codeína o dihidrocodeína, un opioide, en especial heroína, un alcaloide de tropano, en especial cocaína, o una benzodiazepina.

13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que como muestra se emplea un fluido corporal, en especial sangre, orina o saliva.

5 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que se emplea una muestra con un volumen de aproximadamente 5  $\mu$ l a aproximadamente 500  $\mu$ l, en especial de aproximadamente 30  $\mu$ l a aproximadamente 150  $\mu$ l.

15.- Kit, en especial para la puesta en práctica del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende:

- 10 (a) un dispositivo de análisis microfluídico para la determinación de un analito, que comprende:
- (i) una primera zona que está configurada para la introducción de un elemento de extracción de muestras con analito absorbido en el mismo, y para la elución del analito del elemento de extracción de muestras,
- 15 (ii) una segunda zona, que contiene un componente de enlace específico para el analito, y que está unida a la primera zona mediante microcanales, etapas, ramificaciones o/y cámaras, no comprendiendo la segunda zona un elemento de ensayo útil para la identificación del analito,
- (iii) una tercera zona, que comprende al menos un elemento de ensayo para la determinación de la presencia o/y de la cantidad de analito, y que está unida a la segunda zona mediante microcanales, etapas, ramificaciones o/y cámaras,
- 20 (iv) en caso dado una cuarta zona que comprende un agente eluyente para la elución del analito del elemento de extracción de muestras, y que presenta comunicación fluida con la primera zona,
- (v) en caso dado una quinta zona que comprende al menos una función de cronómetro para el control temporal de las reacciones que se desarrollan en el dispositivo de análisis, y
- 25 (vi) en caso dado una carcasa, y
- (b) un elemento de extracción de muestras que se puede alojar en el dispositivo de análisis microfluídico, y comprende, en caso dado, un agente eluyente para la elución del analito del elemento de extracción de muestras.

Fig. 1A

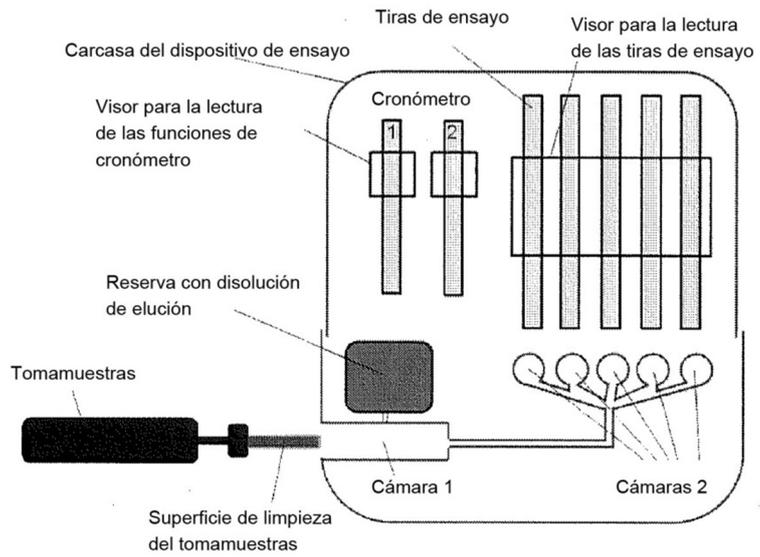


Fig. 1B

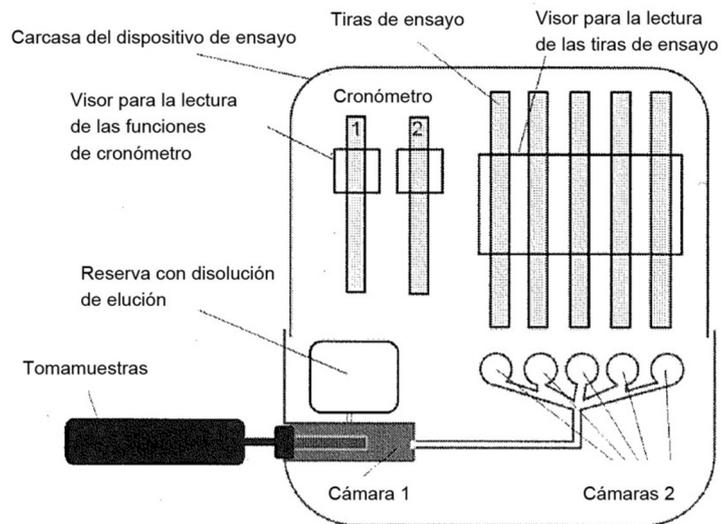


Fig. 1C

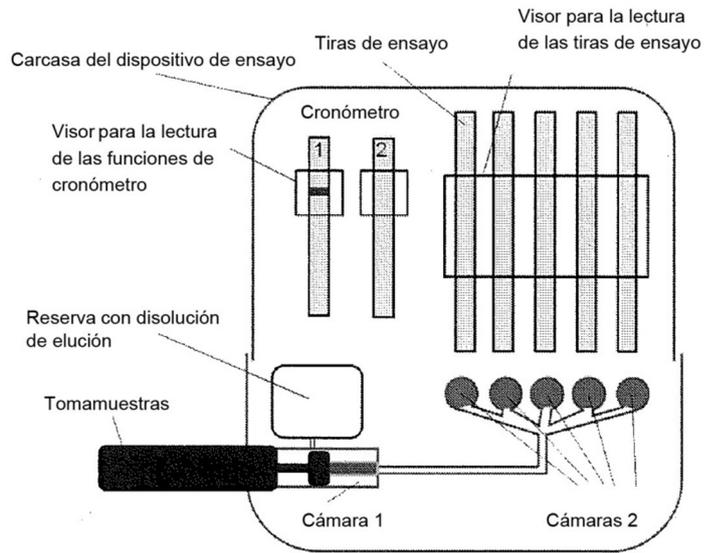
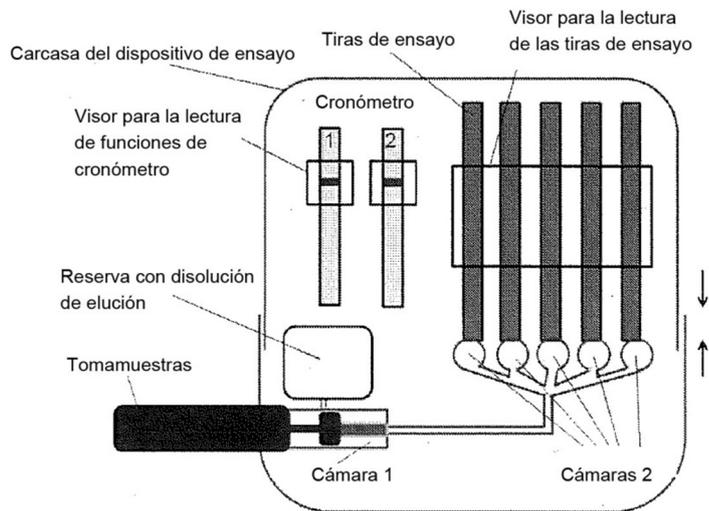
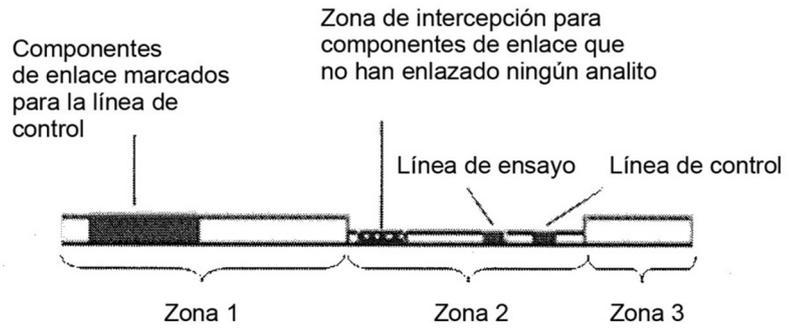


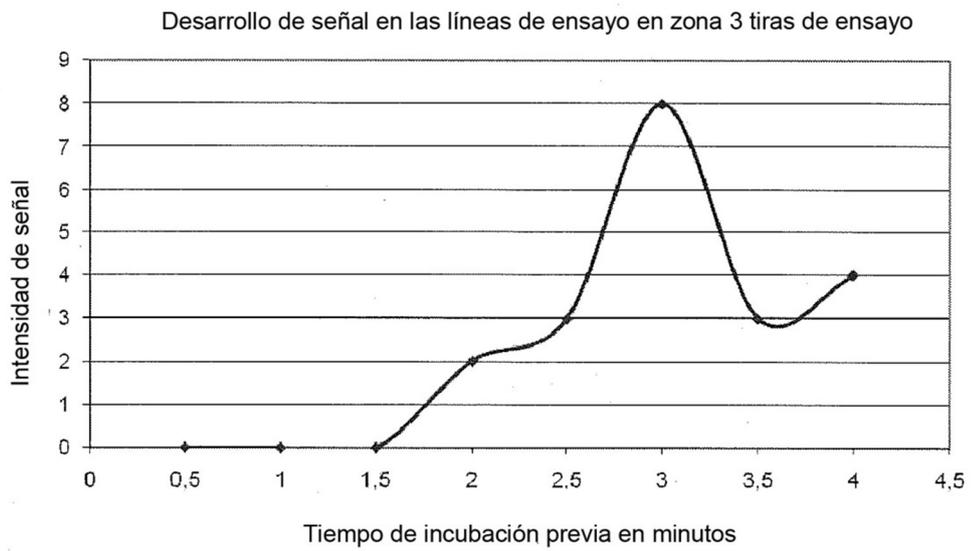
Fig. 1D



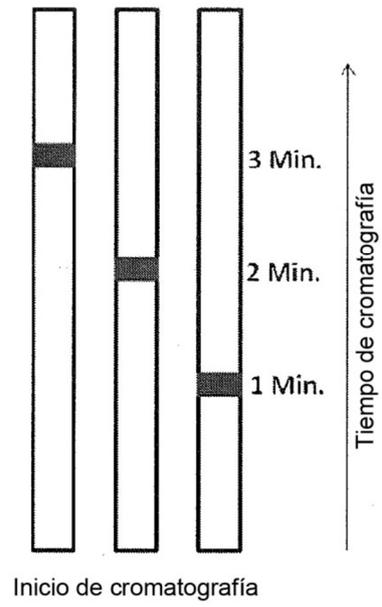
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4A**



**Fig. 4B**

