

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 207**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 13707408 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2823309**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la identificación de analitos**

30 Prioridad:

06.03.2012 EP 12158247

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STADTHAGEN, TORSTEN;
SCHWIEGER, FRANK y
KLAUS, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 568 207 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

Procedimiento y dispositivo para la identificación de analitos

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de analitos, 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 substancia 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 que se trata en el caso de la substancia 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"). El documento US 2005175992 da a conocer procedimientos, elementos de ensayo y kits para la determinación de un analito. El documento EP 2381258 da a conocer un elemento de ensayo similar. El documento US2005/084855 da a conocer reactivos de transferencia, como BSA, que bloquean puntos de enlace sobre
35 elemento de limpieza. Son conocidas toallitas de xilitol por Zhan et al. Journal of Dental Research, 2012, vol. 91, nº 7 Suppl, 1; página 85-página 90.

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
40 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.

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
45 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 aparición de una línea se valora como identificación positiva para el respectivo analito. Otra ventaja de DrugWipe® es el volumen de muestra reducido, que se requiere para la identificación de drogas y otras
50 substancias. Mientras que en el caso de DrugWipe® es suficiente un volumen de muestra de aproximadamente 1 – 50 µl, otros ensayos comerciales requieren un volumen de muestra de al menos 100 µl hasta varios mililitros.

El volumen de muestra reducido, que se requiere para la puesta en práctica del ensayo de detección rápida de
55 drogas DrugWipe®, constituye una ventaja decisiva frente a otros sistemas de ensayo disponibles

comercialmente, ya que los consumidores de drogas, debido a la acción fisiológica de las drogas, tienen frecuentemente una boca muy seca, y solo pueden producir activamente poca saliva. Por consiguiente, en el caso de consumidores de drogas se dispone habitualmente de volúmenes de muestra muy reducidos, que no son suficientes generalmente, con excepción del ensayo de detección rápida de drogas DrugWipe®, para obtener un resultado fiable, o bien exento de errores. En tanto la puesta en práctica de un ensayo rápido de detección de drogas sea posible en tales casos, la toma de muestra dura frecuentemente varios minutos, lo que no es practicable en último término para el voluntario.

El ensayo rápido desarrollado por la firma Varian OraLab® sirve para la identificación de drogas a partir de 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 Δ^9 -tetrahidrocannabinol y cocaína se sitúa en parte incluso claramente por debajo de un 50 % (véase estudio DRUID, publicado en TIAFT 2009 en Genf). Un gran inconveniente de este ensayo se sitúa además en que se requieren volúmenes de muestra relativamente grandes, que no se 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 (TIAFT 2009, Genf). 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 solo 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 Δ^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 Δ^9 -tetrahidrocannabinol, de un 80-90 % (véase estudio DRUID, TIAFT 2009, Genf). Según un estudio de la universidad de Mainz, el índice de resultados de ensayo falsos positivos para Δ^9 -tetrahidrocannabinol se sitúa en más de un 10 %, y la especificidad total se sitúa en un 84 % (publicado por GTFCH 2009, Mosbach, http://www.gtfc.org/cms/images/stories/media/tk/tk76_2/abstractsposter.pdf).

El documento US 2005/0084855 A1 da a conocer un procedimiento para la determinación de un analito en una muestra, que comprende la puesta en contacto de la muestra con un soporte apto para enlace del analito, la puesta en contacto del soporte que contiene analito con un sello que contiene una sonda apropiada para enlace del analito, así como la verificación de la cantidad unida al soporte en sonda. Un inconveniente esencial del procedimiento de identificación consiste en que el sello no es apropiado para la absorción de una muestra de analito de una superficie a investigar, y además se requieren agentes auxiliares técnicos (como por ejemplo un scanner de fluorescencia) para la valoración de los resultados.

Los documentos WO 2005/075982 A2 y US 2005/0175992 A1 dan a conocer respectivamente un procedimiento para la determinación de un analito a partir de patógenos y/o sustancias asociadas a alergia en un fluido corporal. En el ámbito del procedimiento, el fluido corporal se absorbe por medio de un elemento de limpieza separado o integrado en el elemento de ensayo, y éste se pone en contacto con el elemento de ensayo durante un intervalo de tiempo preferentemente de 0,1 a 10 segundos, transfiriéndose al menos una parte de muestra del elemento de limpieza al elemento de ensayo, y analizándose el analito tras comienzo de la cromatografía y enlace a un componente de enlace específico para el analito. Además se describe un kit para la detección de adenovirus, que comprende una tira de ensayo cromatográfica en combinación con un elemento de limpieza.

Un inconveniente decisivo del procedimiento de identificación descrito en los documentos WO 2005/075982 A2 y US 2005/0175992 A1 consiste en que, antes del comienzo de la cromatografía, no se realiza un contacto directo entre el analito y el componente de enlace específico para el analito, con lo cual la formación de un complejo a partir de analito y componente de enlace específico para el analito se puede realizar solo en el transcurso de la cromatografía. Además, el fluido corporal que contiene los analitos no se elabora de ningún modo antes del enlace al componente enlazante que se efectúa en el elemento de ensayo, a modo de ejemplo mediante tratamiento previo químico y/o mecánico de la muestra, por lo cual no se puede conseguir de hecho un enlace óptimo entre analito y componente de enlace específico para el analito.

Sin embargo, en especial muestras biológicas con composición química compleja (por ejemplo sangre, saliva o sudor) están sujetas a una margen de oscilación dependiente de la persona, a modo de ejemplo en relación con consistencia, viscosidad, contenido en sales y/o contenido en proteínas. Si una muestra biológica no se trata

previamente antes del comienzo de la cromatografía, esto ocasiona resultados poco reproducibles, así como pérdidas respecto a la sensibilidad del procedimiento, ya que el analito, debido al enlace en puntos de enlace inespecíficos en la matriz de muestra, ya no se encuentra disponible para la verdadera identificación de analito.

5 Los documentos EP 0 811 842 A2 y EP 0 699 906 A2 dan 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 constituida por uno o varios materiales con actividad capilar aptos para cromatografía, un elemento de extracción de muestras separado a de la superficie de la tira de ensayo, así como un dispositivo de presión para la puesta en contacto de la superficie de la tira de ensayo y el elemento de extracción de muestras, pudiendo estar
10 humedecido el elemento de extracción de muestras con un tampón acuoso, un detergente y/o un disolvente orgánico con el fin de una mayor absorción de analito.

15 El documento EP 2 381 258 A1 da a conocer un procedimiento para la determinación de un analito, que comprende la puesta a disposición de un dispositivo de análisis microfluídico, la absorción de una muestra que contiene el analito por una superficie de muestra con un elemento de limpieza, la introducción del elemento de limpieza que contiene el analito en el dispositivo de análisis microfluídico, la elución de analito del elemento de limpieza dentro del dispositivo de análisis microfluídico con un agente eluyente, así como la determinación del analito en un elemento de ensayo alojado en el dispositivo de análisis microfluídico. En una variante preferente, el elemento de limpieza comprende 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.

20 El documento WO 2005/121793 A2 da a conocer un procedimiento para la identificación de una metanfetamina en una muestra líquida. Para la puesta en práctica del procedimiento se emplea preferentemente un kit, que comprende una tira de ensayo cromatográfica, y en caso dado un elemento de extracción de muestras. La tira de ensayo comprende por su parte (a) un material seco poroso, sobre el cual está inmovilizado un conjugado de pseudoefedrina/soposte o un anticuerpo, que se puede enlazar tanto a la metanfetamina, como también al
25 conjugado, en una zona de detección, y (b) una zona de liberación de marcador separada de la misma, que contiene el anticuerpo en forma marcada, en tanto la zona de detección contenga conjugado de pseudoefedrina/soposte inmovilizado, o puede liberar en el líquido conjugado de pseudoefedrina/soposte detectable, en tanto la zona de detección contenga anticuerpo inmovilizado.

30 También los procedimientos de identificación descritos en los documentos EP 0 699 906 A2, EP 811 842 A2, EP 2 381 258 A1 y WO 2005/121793 A2 tienen el inconveniente de que no se efectúa un tratamiento previo de la muestra antes del comienzo de la cromatografía, y/o no tiene lugar una incubación directa, o bien definida, entre el analito y el componente de enlace específico para el analito. El analito y el componente de enlace específico para el analito entran en contacto entre sí más bien en el transcurso de la cromatografía, debido a lo cual no se puede realizar un enlace óptimo entre el analito y el componente de enlace específico para el analito, y en
35 último término se influye negativamente en la sensibilidad y la especificidad del procedimiento, en especial en la identificación de analitos poco hidrosolubles. Esto conduce al menos parcialmente a que no se alcancen los límites de identificación mínimos requeridos legalmente para moléculas de drogas.

40 Por consiguiente, partiendo de sistemas de ensayo descritos anteriormente, la presente invención tomaba como base la tarea de poner a disposición un procedimiento para la determinación de un analito, en especial para la determinación de drogas, en el que se eliminan al menos en parte los inconvenientes del estado de la técnica. En especial, el procedimiento debía presentar una alta sensibilidad y especificidad para todos los analitos a analizar, ser fácilmente manejable, y posibilitar una determinación rápida de analitos sin el empleo de agentes auxiliares técnicos adicionales.

45 Este problema se soluciona según la invención mediante un procedimiento para la determinación de un analito, que comprende los pasos:

(a) puesta a disposición de un elemento de ensayo que comprende

(i) una primera zona que está configurada para la absorción de agente eluyente,

(ii) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos, y comprende un componente de enlace específico para los analitos,

50 (iii) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica del analito,

(iv) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente, y

(v) en caso dado una carcasa,

(b) absorción de una muestra que contiene los analitos por una superficie de muestra con un elemento de limpieza,

5 (c) puesta en contacto del elemento de limpieza con la segunda zona del elemento de ensayo durante un intervalo de tiempo de al menos 10 segundos, transfiriéndose al menos una parte de la muestra del elemento de limpieza al elemento de ensayo, y efectuándose una incubación de analito con el componente de enlace específico para el analito,

(d) puesta en contacto de la primera zona del elemento de ensayo incubado con un agente eluyente, y

10 (e) determinación de la presencia y/o de la cantidad de analito, comprendiendo el elemento de ensayo y/o el elemento de limpieza un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico.

15 Sorprendentemente, en el ámbito de la presente invención se verificó que, por medio del procedimiento según la invención, se pueden identificar analitos de manera sencilla y reproducible, con sensibilidad y especificidad elevadas, sin que sean necesarias a tal efecto grandes cantidades de muestra ni agentes auxiliares técnicos complejos, a modo de ejemplo para la lectura de resultados de medida.

20 El primer paso del procedimiento según la invención requiere la puesta a disposición de un elemento de ensayo apropiado para la determinación del analito, que comprende un componente de enlace específico para los analitos. Los elementos de ensayo empleados con este fin 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 en una muestra. En este caso, el elemento de ensayo está configurado preferentemente de tal manera que, en presencia del analito a determinar, genera 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 pads de ensayo, sobre los que se puede aplicar el analito, a modo de ejemplo en forma de disolución acuosa o no acuosa.

25 En una forma de ejecución preferente, en el caso del elemento de ensayo se trata de una tira de ensayo cromatográfica, que puede estar constituida por un único material apto para cromatografía, en caso dado en forma de tira, 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 de este modo forman un tramo de transporte, a lo largo del cual puede circular un fluido, impulsado por fuerzas capilares, a través de todas las zonas del elemento de ensayo. En este caso se puede emplear como material cromatográfico cualquier material absorbente de líquido, poroso o con actividad capilar conocido, como por ejemplo celulosa o derivados de la misma, fibras de vidrio, así como vellones y tejidos de 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.

30

35

40 El componente de enlace específico para el analito puede ser cualquier sustancia química que se enlace al analito a analizar, pero que no forme ningún tipo de enlace con otras sustancias, presentes eventualmente en la muestra y/o en el elemento de ensayo. Las sustancias químicas que corresponden a este perfil de requisitos son generalmente conocidas por el especialista, o se pueden obtener correspondientemente a los requisitos en el respectivo elemento de ensayo por medio de experimentos rutinarios, y bajo aplicación de técnicas conocidas. Preferentemente, el componente de enlace específico para el analito es móvil en los elementos de ensayo descritos en este caso, y se puede inmovilizar en el elemento de ensayo, a modo de ejemplo, por medio de un reactivo de captura posicionado de modo apropiado en una posición predeterminable. Se describen componentes de enlace específicos para el analito, cuyo empleo se ha mostrado especialmente ventajoso, a modo de ejemplo en el documento EP 1 579 222 B1, a cuya manifestación se hace referencia expresamente.

45

50 En una forma de ejecución preferente, en el caso del componente de enlace específico para el analito se trata de un anticuerpo o de 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 a los analitos, asignada para el mismo. Un "fragmento de anticuerpo no funcional" designa, por consiguiente, un fragmento de anticuerpo que no forma un enlace o un enlace específico con el analito, y en este aspecto no cumple la función de un enlace específico a los analitos, asignada para el mismo.

55 Para facilitar la identificación de analitos por medio de los elementos de ensayo descritos en este caso, 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. De modo especialmente preferente, en el caso del marcaje se trata de un marcaje de oro, que posee la ventaja de que el resultado de ensayo se puede registrar y valorar de manera óptica-visual directamente por el usuario. Las técnicas por medio de las cuales se pueden introducir los marcajes descritos anteriormente en una molécula a marcar, son conocidas por el especialista y no se explican más detalladamente en este sentido.

Para la determinación del analito bajo empleo de los elementos de ensayo descritos en este caso, en un paso adicional se absorbe una muestra que contiene los analitos por una superficie a analizar (por ejemplo lengua, piel, otras superficies) por medio de un elemento de limpieza apropiado. En este caso, como elemento de limpieza se puede emplear cualquier elemento que sea apto para absorber una muestra de analito, y posibilite una subsiguiente transferencia de la muestra al elemento de ensayo, a modo de ejemplo bajo utilización de efectos capilares. El elemento de limpieza presenta una o varias superficies de limpieza (independientes entre sí), siendo preferentes elementos de limpieza con 2, 3 o 4 superficies de limpieza en el caso de varias superficies de limpieza. En tanto se emplee un elemento de ensayo con varias superficies de limpieza, en la posterior reunión de un dispositivo de ensayo, que comprende varios elementos de ensayo (independientes entre sí), y el elemento de limpieza, se pone en contacto respectivamente un elemento de ensayo con una superficie de limpieza del elemento de limpieza.

La superficie de limpieza, al menos una, que está soldada preferentemente con una superficie del elemento de limpieza, puede estar constituida en principio por cualquier material que el especialista considere útil para los fines de la presente invención, y posibilite tanto una concentración de analito en la superficie de limpieza, como también una posterior transferencia del analito al elemento de ensayo. En este caso se han mostrado convenientes especialmente materiales absorbentes, en especial tejidos, vellones y/o matrices porosas (por ejemplo membranas y esponjas). En el ámbito de la invención se emplean de modo especialmente preferente vellones, en especial vellones a base de fibras de celulosa, poliéster y/o vidrio, pudiéndose cohesionar las fibras, en caso dado, con ayuda de un agente aglutinante orgánico. Se describen vellones apropiados, o bien fibras, a modo de ejemplo, en los documentos DE 38 02 366 A1 y EP 0 699 906 A2, a cuya manifestación se hace referencia expresamente.

En lo que se refiere al acondicionamiento externo de la(s) superficie(s) de limpieza, en principio no existen limitaciones respecto a grosor, dimensión y geometría. El grosor de la(s) superficie(s) de ensayo, o bien del material empleado a tal efecto, es de significado subordinado para los fines de la presente invención, y se sitúa habitualmente en un intervalo de 0,1 a 3 mm. La dimensión de la(s) superficie(s) de limpieza está adaptada ventajosamente a la dimensión del elemento de limpieza, es decir, la anchura de la(s) superficie(s) de ensayo no debía sobrepasar ni ser inferior a la anchura del elemento de ensayo. Las dimensiones preferentes de la(s) superficie(s) de ensayo se sitúan en el intervalo de 0,3 a 2 cm respecto a la longitud, en el intervalo de 0,3 a 1 cm respecto a la anchura. La geometría de la(s) superficie(s) de limpieza se puede adaptar a los respectivos requisitos en la superficie a analizar, considerándose especialmente ventajoso una configuración triangular, rectangular (por ejemplo cuadrada, rectangular, romboidal) o cilíndrica de la(s) superficie(s) de ensayo. En este caso, una configuración cilíndrica de la(s) superficie(s) de ensayo tiene la ventaja de que, a través de la gran superficie del (de las) área(s) de limpieza se realiza un contacto especialmente bueno entre el elemento de limpieza y la segunda zona del elemento de ensayo, y correspondientemente se puede conseguir un aumento de la sensibilidad del procedimiento.

Para garantizar una sensibilidad y especificidad especialmente elevada en la determinación del analito, el procedimiento según la invención prevé que el elemento de ensayo y/o el elemento de limpieza comprenda un reactivo de transferencia de analito. En una forma de ejecución de la invención, el elemento de ensayo empleado para la determinación del analito comprende el reactivo de transferencia de analito, mientras que en otra forma de ejecución el elemento de limpieza contiene el reactivo de transferencia de analito. No obstante, de modo especialmente preferente, tanto el elemento de ensayo, como también el elemento de limpieza, comprenden un reactivo de transferencia de analito, como se define en detalle a continuación.

El reactivo de transferencia de analito contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico, designando el concepto "sustancia inespecífica para el analito" una sustancia química que no se enlaza exclusivamente al analito a analizar, sino que también puede formar enlaces con otras sustancias presentes eventualmente en la muestra y/o en el elemento de ensayo. La concentración de proteína, mezcla de proteínas, hidrato de carbono, o bien alcohol sacárico, en el reactivo de transferencia de analito/los reactivos de transferencia de analito, se puede adaptar al elemento de ensayo por parte del especialista correspondientemente a los respectivos requisitos, pero en lo habitual asciende, no obstante, a aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 15 % en peso, referido a la mezcla total de reactivo de

transferencia de analito.

En tanto el elemento de ensayo comprenda el reactivo de transferencia de analito, además se debe considerar preferente que el reactivo de transferencia de analito contenga un hidrato de carbono y/o un alcohol sacárico, en especial un alcohol sacárico. Por consiguiente, el elemento de limpieza comprende preferentemente un reactivo de transferencia de analito, que contiene una proteína inespecífica para el analito o/y una mezcla de proteínas inespecífica para el analito, en especial una proteína inespecífica para el analito. Como proteína inespecífica para el analito, en los elementos de ensayo y/o elementos de limpieza descritos en este caso se emplea preferentemente una albúmina, en especial ovoalbúmina o albúmina de suero vacuno, mientras que como mezcla de proteínas inespecífica para el analito se puede aplicar, a modo de ejemplo, gelatina o leche desnatada en polvo.

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, gulosa, 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 isomalta, lactitol y maltitol. En una forma especialmente preferente de ejecución de la invención, en el caso del alcohol sacárico se trata de una sustancia seleccionada a partir del grupo constituido por glucitol, glicerol, manitol y xilitol.

El reactivo de transferencia de analito, que favorece la transferencia de analito de la superficie a analizar al elemento de limpieza y/o la subsiguiente transferencia de analito del elemento de limpieza al elemento de ensayo, en especial mediante bloqueo de puntos de enlace libres en el elemento de limpieza o/y mediante influencia de las propiedades del analito, puede estar impregnado, a modo de ejemplo, en el elemento de ensayo o/y el elemento de limpieza, en especial en la zona de la(s) superficie(s) de limpieza. Las técnicas que se pueden emplear para la aplicación del reactivo de transferencia de analito sobre el elemento de ensayo o/y el elemento de limpieza, son conocidas por el especialista, y se pueden elegir selectivamente correspondiendo a los requisitos en el elemento de ensayo.

Para garantizar una absorción lo más completa posible de analito, la superficie de limpieza, al menos una, del elemento de limpieza, en el caso de análisis de superficies secas, se puede humedecer con una cantidad reducida, a modo de ejemplo con aproximadamente 1 – 100 μ l, de un líquido apropiado. Con este fin, el líquido se puede aplicar, a modo de ejemplo por medio de una pipeta, un dispositivo de dosificación automático, o un material que desprende el líquido (por ejemplo una esponja impregnada con el líquido) sobre la(s) superficie(s) de limpieza. Alternativamente, la humectación de la(s) superficie(s) de ensayo se puede efectuar también de modo que la superficie de limpieza, al menos una, contenga el líquido en forma microencapsulada o envasada en blisters, y el líquido se libere sobre la superficie a investigar mediante medidas apropiadas, a modo de ejemplo mediante prensado de la(s) superficie(s) de limpieza. Los líquidos que son apropiados para una humectación de superficie(s) de limpieza comprenden en especial agua y disoluciones tampón acuosas, que pueden contener, en caso dado, otras sustancias, como por ejemplo un detergente o/y un disolvente orgánico, como se describe anteriormente en cada caso. En tanto el elemento de limpieza se ponga en contacto con superficies húmedas o muestras líquidas, generalmente no es necesaria una humectación previa de la(s) superficie(s) de limpieza.

Tras absorción de la muestra, en un paso adicional del procedimiento según la invención, el elemento de limpieza se pone en contacto con la segunda zona del elemento de ensayo, que comprende el componente de enlace específico para el analito, preferentemente mediante ligera presión mecánica de su(s) superficie(s) de limpieza, transfiriéndose al menos una parte de la muestra del elemento de limpieza al elemento de ensayo. La presión con la que el elemento de limpieza se presiona sobre el elemento de ensayo debía ser al menos tan elevada que se diera un contacto superficial entre la superficie del elemento de ensayo y la superficie de limpieza/las superficies de limpieza del elemento de limpieza, y en este sentido se posibilitara una comunicación fluida entre ambos elementos. Mediante el contacto directo entre elemento de limpieza y la segunda zona del elemento de ensayo se realiza un contacto directo, y con ello rápido, entre el analito y el componente de enlace

específico para el analítico, mediante lo cual se puede efectuar una formación rápida de complejo a partir de analito y componente de enlace específico para el analito, y se mejora la sensibilidad y especificidad del procedimiento de identificación.

5 En una variante preferente, para mejorar adicionalmente la sensibilidad y especificidad del procedimiento, la segunda zona del elemento de ensayo configurada para la aplicación de la muestra comprende adicionalmente al menos un agente que ocasiona una elaboración química o/y mecánica de la muestra que contiene los analitos, a modo de ejemplo mediante bloqueo, o bien destrucción de puntos de enlace inespecíficos en la muestra o/y mediante modificación de la consistencia de la muestra. De este modo, el analito se encuentra disponible de manera óptima para un enlace en el componente de enlace específico para el analito (por ejemplo en un anticuerpo), por lo cual se mejora la accesibilidad del analito para los componentes de enlace específicos para el analito, así como el transporte a través de las zonas aisladas del elemento de ensayo. En tanto se emplee un agente químico de elaboración de muestras, éste puede estar absorbido, a modo de ejemplo, en el elemento de ensayo, empleándose para la impregnación preferentemente una disolución acuosa o no acuosa, que contiene el agente químico de elaboración de muestras en una concentración de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 5 % en peso. De modo especialmente preferente, en el elemento de ensayo se aplica paralelamente al menos un agente químico de elaboración de muestras, y al menos un agente mecánico de elaboración de muestras.

20 Los agentes químicos de elaboración de muestras, que se pueden aplicar en el ámbito del procedimiento según la invención, comprenden en especial ácidos, bases, tampones, disolventes orgánicos y detergentes, considerándose especialmente preferentes bases y detergentes. Los ejemplos concretos de ácidos comprenden ácidos inorgánicos (por ejemplo ácido clorhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo ácido acético y ácido cítrico). Las bases ejemplares comprenden en especial hidróxidos metálicos alcalinos y alcalinotérreos, como por ejemplo hidróxido sódico e hidróxido de calcio, mientras que como tampón se pueden emplear, entre otros, carbonato de calcio, Tris, PBS, tampón fosfato, tampón borato, tampón BICINE y HEPES. Los ejemplos de detergentes comprenden, entre otros, octilglucósido, colamidopropanosulfonato, polidocanol, polialquilenglicoléter (por ejemplo Brij®, Synperonic®) y polisorbatos (por ejemplo Tween® 20, Tween® 80). Los disolventes orgánicos ejemplares comprenden en especial dimetilsulfóxido, etanol, glicerina, isopropanol, metanol, y mezclas de los mismos.

30 Los agentes mecánicos de elaboración de muestras, que se pueden aplicar en el ámbito del procedimiento según la invención, comprenden, a modo de ejemplo, tejidos y/o vellones, en especial vellones, por medio de los cuales se filtra, o bien se separa la muestra antes de incubación del analito con el componente de enlace específico para el analito, de modo que se retienen componentes de muestra especialmente sólidos y viscosos (por ejemplo componentes de saliva sólidos y viscosos), que pueden influir negativamente en el procedimiento de identificación. Los ejemplos concretos de vellones, que pueden ocasionar una elaboración mecánica de la muestra, comprenden, a modo de ejemplo, los productos adquiribles comercialmente Ahlstrom 8964, Whatman Rapid 24Q y Freudenberg FS 2216, pero no se limitan a éstos.

40 Para facilitar al usuario la puesta en contacto de elemento de ensayo y elemento de limpieza, en una forma de ejecución de la invención, uno o varios elementos de ensayo pueden estar alojados en una carcasa. En este caso, la carcasa presenta preferentemente al menos una escotadura, a través de la cual se puede poner en contacto el elemento de limpieza con la zona del respectivo elemento de ensayo configurada para la aplicación de la muestra. En tanto el elemento de limpieza presente varias superficies de limpieza, se debe considerar preferente que la carcasa contenga únicamente una única escotadura para el alojamiento del elemento de limpieza. En este sentido, alternativamente también es posible que la carcasa contenga un número de escotaduras correspondiente al número de superficies de limpieza.

45 La(s) escotadura(s) puede/pueden estar dispuestas en cualquier forma (respectivamente), y presentar cualquier dimensión y geometría que el especialista considere apropiada, pero habitualmente está/están adaptada(s) a la disposición, la dimensión y la geometría de la(s) superficie(s) de limpieza del elemento de limpieza. De este modo es posible, por ejemplo, obtener una reunión de elemento de limpieza y elemento de ensayo definida previamente, para evitar de este modo una utilización indebida del sistema de ensayo (véase la figura 3).

50 En otra forma de ejecución, la carcasa puede comprender además un dispositivo de sujeción, que permite una fijación reversible del elemento de limpieza a la carcasa, de modo que esta última se puede retirar, a modo de ejemplo, para la toma de muestras, y colocar de nuevo en la carcasa tras la toma de muestras. En este caso, mediante selección de una posición apropiada para el dispositivo de sujeción se puede situar el elemento de limpieza en la carcasa de modo que se asegura un contacto intensivo entre elemento de limpieza, o bien su(s) superficie(s) de limpieza, y el elemento de ensayo, lo que garantiza una buena transferencia de analito del elemento de limpieza al elemento de ensayo que comprende el componente de enlace específico para el analito.

Según la invención, el elemento de ensayo y el elemento de limpieza humedecido con el analito se ponen en contacto entre sí para una sensibilidad y especificidad de la determinación de analitos más elevada, durante un intervalo de tiempo de al menos 10 segundos, incubándose el componente de enlace específico para el analito, que se encuentra en el elemento de ensayo, con el analito a determinar, y efectuándose, en caso dado
5 adicionalmente, una elaboración química y/o mecánica de la muestra que contiene los analitos. De este modo se asegura por una parte que el analito se desprenda lo más completamente posible de la matriz de muestra del elemento de limpieza, y por otra parte que pueda reaccionar casi cuantitativamente con el componente de
10 enlace específico para el analito. En este contexto se ha mostrado ventajoso un tiempo de incubación de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 600 segundos, de modo más preferente de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 300 segundos, del modo más preferente de aproximadamente 60 segundos a aproximadamente 180 segundos. Mediante tal control de procedimiento, el volumen de muestra necesario para la determinación del analito se reduce habitualmente a menos de 10 µm, y la sensibilidad del sistema de ensayo se mejora claramente.

A continuación de la incubación con el analito, el elemento de ensayo se pone en contacto con un agente eluyente. Con este fin, el elemento de ensayo comprende preferentemente una zona terminal, que está configurada para la absorción de agente eluyente, y habitualmente un material absorbente, como por ejemplo tejido y/o vellón. Tras humectación de esta zona con agente eluyente, el agente eluyente migra a través de las
15 diversas zonas del elemento de ensayo, transportándose concomitantemente analito, componente de enlace específico para el analito, así como sus complejos de modo correspondiente. En este caso se puede utilizar ventajosamente la acción capilar de los componentes aislados del elemento de ensayo, que se disponen, o bien se unen entre sí, de tal manera que se garantiza un flujo de agente eluyente ininterrumpido.

En el ámbito de la presente invención se puede emplear como agente eluyente en principio cualquier agente eluyente que el especialista considere conveniente. Sin embargo, en el procedimiento aquí descrito se aplica preferentemente agua y disoluciones tampón acuosas, que pueden contener, en caso dado, otras sustancias,
25 como por ejemplo un hidrato de carbono, o un alcohol sacárico, un detergente y/o un disolvente orgánico, como se describe anteriormente en cada caso, en una concentración de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 1,5 % en peso. En una forma preferente de ejecución de la invención, el agente eluyente comprende un alcohol sacárico, como se define anteriormente, y/o un derivado del mismo, en el que al menos un grupo hidroxilo del alcohol sacárico está substituido por un grupo mercapto. En el ámbito del procedimiento
30 según la invención se considera especialmente preferente un agente eluyente preferentemente acuoso, que comprende 1,4-ditioeritritol como componente, mediante cuyo empleo se puede conseguir un aumento de la sensibilidad y/o especificidad de la determinación de analitos.

En tanto el elemento de ensayo esté alojado en una carcasa, en dependencia de la configuración de la carcasa existen diversas posibilidades para ocasionar una humectación del elemento de ensayo con agente eluyente. Si
35 el elemento de ensayo está completamente alojado en la carcasa, el agente eluyente se puede aplicar, a modo de ejemplo, mediante presión sobre una ampolla que contiene el agente eluyente, que está alojada preferentemente dentro de la carcasa, sobre la primera zona del elemento de ensayo, configurada para la absorción de agente eluyente. Si la primera zona del elemento de ensayo, configurada para la absorción de agente eluyente, sobresale de la carcasa, existe posibilidad de sumergir la zona en el agente eluyente.

Tras puesta en contacto del elemento de ensayo con el agente eluyente se pone en marcha la determinación de analito, que se efectúa preferentemente por vía inmunológica y comprende, a modo de ejemplo, un formato de ensayo competitivo o/y un formato de ensayo no competitivo (formato de ensayo tipo sandwich), en especial una combinación de un formato de ensayo competitivo y un formato de ensayo no competitivo. Habitualmente, el
40 procedimiento de identificación según la invención comprende en primer lugar la formación de un complejo a partir de moléculas de analito y componente de enlace específico para el analito, en caso dado marcado, que se transporta de modo subsiguiente con ayuda del agente eluyente, a modo de ejemplo junto con componente de enlace no enlazado o/y otras sustancias presentes en la muestra, hasta una zona del elemento de ensayo que está configurada para la detección óptica de analito.

La zona configurada para la detección óptica de analito comprende habitualmente varias secciones definidas, en
50 las que pueden estar inmovilizados diversos reactivos. En una forma de ejecución, esta zona comprende una sección que está configurada para el enlace de componente de enlace específico para el analito no enlazado, una sección que está configurada para el enlace de complejo constituido por analito y componente de enlace específico para el analito, y en caso dado una sección en la que se genera una señal de control dependiendo del analito (véase figura 1). En este caso, la zona configurada para la detección óptica de analito puede estar
55 formada por uno o varios materiales, que el especialista considere apropiados para los fines de la invención, como por ejemplo membranas de Nylon®, nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno.

La sección prevista para el enlace de componente de enlace específico para el analito no enlazado puede comprender, a modo de ejemplo análogos de analito inmovilizados, en especial polihaptenos, que capturan el componente de enlace específico para el analito, en caso dado marcado, debido a la formación de un complejo

en una posición definida sobre el elemento de ensayo (línea de captura), 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 captura, ya que el analito bloquea los puntos de enlace necesarios a tal efecto en el componente de enlace específico para el analito.

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

10 Para poder leer claramente la señal en la línea de ensayo y para excluir confusiones con la línea de captura, la línea de captura se puede cubrir, en caso dado de modo apropiado. En tanto el elemento de ensayo comprenda además una sección de control, en la puesta en práctica del procedimiento aparece adicionalmente una línea de control, que actúa como indicador para una funcionalidad inmejorable del elemento de ensayo. El agente eluyente excedente, que abandona la zona del elemento de ensayo configurada para la detección óptica de analito, se puede absorber con ayuda de material absorbente de líquido en una zona del elemento de ensayo configurada especialmente a tal efecto.

15 En otra forma de ejecución, la zona configurada para la detección óptica del analito, como se describe anteriormente, no comprende una sección configurada para el enlace de componente de enlace específico para el analito no enlazado (véase la figura 2). En este caso, para la generación del complejo a partir de analito y componente de enlace específico para el analito se emplea preferentemente un componente de enlace específico para el analito especial, como se describe, a modo de ejemplo, en el documento EP 1 579 222 B1. Por consiguiente, tales complejos se pueden inmovilizar por medio de un componente de enlace específico para el complejo, lo que conduce en último término a una detección simplificada de analito, ya que se evita la generación de señales falsas positivas, que se pueden ocasionar, entre otras maneras, mediante el componente de enlace específico para el analito no enlazado en la línea de captura.

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

25 La determinación cualitativa y/o cuantitativa de analito llevada a cabo en el último paso del procedimiento según la invención se puede efectuar de cualquier modo. A tal efecto se pueden emplear en principio todos los métodos para la identificación de una formación de complejo conocidos por el estado de la técnica, que generan una señal mensurable, que se puede valorar, o bien leer manualmente o bajo empleo de agentes 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.

30 En una forma de ejecución especialmente preferente, por medio del procedimiento según la invención se determinan varios analitos diferentes, en especial 2 a 20 analitos distintos, de manera simultánea. En este caso, el elemento de ensayo comprende habitualmente un número de componentes de enlace específicos para el analito diferentes correspondiente al número de analitos diferentes en la segunda zona configurada para la aplicación de la muestra, y, en tanto el elemento de ensayo no contenga ninguna sección para la captura de componentes de enlace específicos para el analito no enlazados, en caso dado un número de componentes de enlace específicos para el complejo correspondiente al número de analitos diferentes, como se describen anteriormente. De este modo se puede asegurar que la determinación paralela de diversos analitos en el elemento de ensayo se efectúe esencialmente de modo independiente entre sí, y no se presente ningún tipo de interferencias.

35 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 aquí descrito se pueden identificar analitos hasta un límite de

identificación inferior de aproximadamente 1 ng/ml de muestra.

Según la invención es preferente además que el elemento de ensayo o/y el elemento de limpieza empleado en el ámbito del procedimiento aquí descrito sea estéril antes del contacto con la muestra que contiene los analitos. En este caso, el elemento de ensayo o/y el elemento de limpieza se pueden introducir en un depósito de reserva apropiado antes o después de la esterilización, debiéndose considerar preferente una introducción correspondiente antes de la puesta en práctica de la esterilización. La propia esterilización se puede efectuar de diversas maneras, y comprende, a modo de ejemplo, esterilización química, esterilización mediante calentamiento y esterilización por medio de radiación ionizante. El elemento de ensayo esterilizado se envasa preferentemente en medio estéril, en caso dado junto con el elemento de limpieza, a continuación de la esterilización. El envasado estéril posibilita mantener en condiciones estériles tanto elemento de ensayo, como también elemento de limpieza, hasta un empleo posterior sin que se requiera una nueva esterilización. En el caso del elemento de ensayo, o bien del elemento de limpieza aquí descrito, se trata de modo especialmente preferente de un artículo desechable, que no se emplea de nuevo tras uso.

El procedimiento según la invención se puede emplear para la determinación de cualquier sustancia biológica o química, que sea identificable, a modo de ejemplo, bajo empleo de técnicas inmunológicas. En este sentido, el procedimiento aquí descrito se emplea preferentemente para la identificación de estupefacientes, como están alistados en la ley alemana de estupefacientes. Los ejemplos concretos de tales estupefacientes comprenden, entre otros, agentes disociativos, delirantes, empatógenos, contactógenos, hipnóticos, narcóticos, psicodélicos, sedantes y estimulantes, pero no están limitados a los mismos. En una forma de ejecución más preferente, según la invención se determina al menos un analito seleccionado a partir del grupo constituido por anfetaminas, benzodiacepinas, cannabinoides, en especial Δ^9 -tetrahidrocannabinol, ketaminas, metanfetaminas, opiáceos, en especial morfina, codeína o dihidrocodeína, opioides naturales o sintéticos, en especial heroína, y alcaloides de tropano, en especial cocaína, siendo especialmente preferentes Δ^9 -tetrahidrocannabinol y cocaína como analitos.

El analito puede proceder de cualquier fuente, como por ejemplo de una superficie de un objeto humedecido 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 0,01 μ l a aproximadamente 100 μ l, de modo preferente de aproximadamente 0,05 μ l a aproximadamente 20 μ l, de modo más preferente de aproximadamente 0,1 μ m a \leq 10 μ l, y del modo más preferente de aproximadamente 0,5 μ l a aproximadamente 5 μ l.

En otro aspecto, la invención se refiere a un elemento de ensayo para la determinación de un analito, que comprende:

- (i) una primera zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente,
- (ii) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos, y comprende un componente de enlace específico para los analitos,
- (iii) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica de analito,
- (iv) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente,
- (v) en caso dado una carcasa, y
- (vi) un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al empleo de un elemento de limpieza en un procedimiento como se describe anteriormente, para la absorción de un analito de una superficie, y para la transferencia del analito a un elemento de ensayo, comprendiendo el elemento de ensayo un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia específica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico. En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para la determinación de un analito, que se emplea preferentemente para la puesta en práctica del procedimiento descrito anteriormente, y comprende los siguientes componentes:

- (a) un elemento de ensayo, que comprende
 - (i) una primera zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente,
 - (ii) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos, y comprende un componente de enlace específico para los analitos,
 - (iii) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica de analito,
 - (iv) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente, y
 - (v) en caso dado una carcasa, y

(b) un elemento de limpieza que está configurado para la absorción de una muestra de analito,

comprendiendo el elemento de ensayo o/y el elemento de limpieza un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico.

5 En lo que se refiere a configuraciones preferentes del elemento de ensayo según la invención, del empleo según la invención del elemento de limpieza y del elemento de ensayo, o bien elemento de limpieza contenido en el kit según la invención, se remite a las explicaciones en relación con la descripción del procedimiento según la invención.

La invención se explicará más detalladamente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

10 Descripción de las figuras

Figura 1: 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:

- 15 (a) una primera zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente (zona 1),
- (b) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos y un componente de enlace específico para el analito, marcado, así como, en caso dado, otros reactivos (zona 2),
- 20 (c) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica de analito, y una línea de captura, una línea de ensayo y una línea de control (zona 3), y
- (d) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente (zona 4).

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:

- 25 (a) una primera zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente (zona 1),
- (b) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos y un componente de enlace específico para el analito, marcado, así como, en caso dado, otros reactivos (zona 2),
- 30 (c) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica de analito, y una línea de ensayo y una línea de control (zona 3), y
- (d) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente (zona 4).

Figura 3: representación de una forma de ejecución de un elemento de limpieza y un dispositivo de ensayo para la puesta en práctica del procedimiento según la presente invención. El elemento de limpieza comprende tres superficies de limpieza separadas entre sí espacialmente (respectivamente en forma triangular) para la absorción de al menos 3 analitos diferentes. El dispositivo de ensayo comprende tres elementos de ensayo separados entre sí espacialmente (respectivamente en forma de una tira de ensayo), así como una carcasa que contiene los elementos de ensayo, que comprende por su parte una escotadura para la lectura de los resultados de ensayo, así como una escotadura para la puesta en contacto del elemento de limpieza con los elementos de ensayo.

Figura 4: representación de otra forma de ejecución de un elemento de limpieza y un dispositivo de ensayo para la puesta en práctica del procedimiento según la presente invención. El elemento de limpieza comprende tres superficies de limpieza separadas entre sí espacialmente (respectivamente en forma de cilindro) para la absorción de al menos 3 analitos diferentes. El dispositivo de ensayo comprende tres elementos de ensayo separados entre sí espacialmente (respectivamente en forma de una tira de ensayo), así como una carcasa que contiene los elementos de ensayo, que comprende por su parte una escotadura para la lectura de los resultados de ensayo, así como una escotadura para la puesta en contacto del elemento de limpieza con los elementos de ensayo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de inmunógeno de Δ^9 -THC

Se diluyeron 1,25 ml de una disolución madre de ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico A (ácido 1-hidroxi-(6aR,10aR)-6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[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).

- 5 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 Δ^9 -tetrahidrocannabinólico A en N,N-dimetilformamida descrita anteriormente, otros 6 ml de agua destilada, así como 0,2 ml de una disolución de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (firma Sigma Aldrich) en N,N-dimetilformamida (concentración 500 mg/ml).

- 15 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 Δ^9 -THC se diferencia de la banda de albúmina de suero vacuno.

Ejemplo 2: obtención de anticuerpos contra Δ^9 -THC

- 20 Se inmunizaron 20 ratones con el inmunógeno de Δ^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.

- 25 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 Δ^9 -THC. A tal efecto, las placas de microtitración revestidas con estreptavidina se incubaron en primer lugar con 10 ml de una disolución de Δ^9 -tetrahidrocannabinol-[N'-biotinilaminocaproil-(3,6-dioxo-8-aminoctil)-amida] en disolución acuosa tamponada con fosfato, que se había obtenido previamente mediante reacción de Δ^9 -tetrahidrocannabinolsuccinimidiléster y N-(biotinilaminocaproil)-1,8-diamino-3,6-dioxo-octano (firma Applichem), y se incubó durante 12 h a 4°C.

- 30 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 Δ^9 -THC para la obtención de anticuerpos contra Δ^9 -THC.

Ejemplo 3: obtención de un anticuerpo marcado con oro contra Δ^9 -THC

- 40 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 Δ^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: empleo de glucitol para el aumento de sensibilidad y especificidad

- 45 Se impregnó una zona formada por vellón de una tira de ensayo cromatográfica, que contenía un anticuerpo específico para Δ^9 -THC según el ejemplo 3, con tres disoluciones de glucitol (firma Sigma) de diferente concentración en agua destilada.

- 50 A continuación se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de Δ^9 -THC diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de Δ^9 -THC de 100 ng/ml. Tras aplicación de 10 µl de esta saliva de zona de almacenamiento dotada sobre la superficie de limpieza de un elemento de limpieza comercial (firma Securetec Detektionssysteme) se puso en contacto el elemento de limpieza con la zona impregnada de la tira de ensayo cromatográfica, y las tiras de ensayo se incubaron durante un intervalo de tiempo de 60 segundos a temperatura ambiente.

Tras incubación con la muestra de analito se sumergieron las tiras de ensayo durante 15 segundos en agua

corriente, y de este modo se inició el proceso de cromatografía. El tiempo de desarrollo del ensayo completo ascendía a 5 hasta 10 minutos. Los resultados de las tres determinaciones están representados en la tabla 1.

Tabla 1

Concentración de glucitol (% en peso en la disolución de impregnación)	Señal de línea de ensayo para Δ^9 -THC
2%	Positiva
1%	Ligeramente positiva
0%	Negativa

- 5 Como se desprende de la tabla 1, una impregnación del vellón con concentraciones crecientes de glucitol conduce a una transferencia de saliva mejorada del elemento de limpieza a la tira de ensayo cromatográfica. Glucitol mejora simultáneamente la extracción de Δ^9 -THC de la muestra de saliva.

10 Un mejor contacto entre Δ^9 -THC y el anticuerpo marcado, dispuesto en la zona de la tira de ensayo en contacto, posibilita ambas simultáneamente, lo que ocasiona un enlace claramente más específico y más sensible de Δ^9 -THC al componente de enlace específico, y conduce a un desarrollo de señal intensificado en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica.

Ejemplo 5: empleo de 1,4-ditioeritritol en el agente eluyente para el aumento de la sensibilidad y la especificidad

15 Se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de Δ^9 -THC diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de Δ^9 -THC de 80 ng/ml. Tras aplicación de 10 μ l de esta saliva de zona de almacenamiento dotada sobre la superficie de limpieza de un elemento de limpieza comercial (firma Securetec Detektionssysteme) se puso en contacto el elemento de limpieza con una zona de una tira de ensayo cromatográfica formada por vellón, que contenía un anticuerpo específico para Δ^9 -THC según ejemplo 3, y las tiras de ensayo se incubaron durante un intervalo de tiempo de 60 segundos a temperatura ambiente.

20 Tras incubación con la muestra de analito se sumergieron las tiras de ensayo durante 15 segundos en agua bidestilada, que contenía 1,4-ditioeritritol, adquirible comercialmente bajo el nombre comercial Sputolysin® (firma VWR), en cuatro concentraciones diferentes, y de este modo se inició el proceso de cromatografía. El tiempo de desarrollo de ensayo completo ascendía a 5 hasta 10 minutos. Los resultados de las cuatro determinaciones están representados en la tabla 2.

25 Tabla 2

Concentración de 1,4-ditioeritritol en el agente eluyente (% en peso)	Señal de línea de ensayo para Δ^9 -THC
5%	Negativa
1%	Ligeramente positiva
0.1%	Positiva
0%	Ligeramente positiva

Como se desprende de la tabla 2, un mezclado de 1,4-ditioeritritol al agente eluyente en un intervalo de concentración de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 1 % en peso conduce a un desarrollo de señal intensificado en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica.

Ejemplo 6: empleo de hidróxido sódico para el aumento de la sensibilidad y la especificidad

5 Se impregnó una zona de una tira de ensayo cromatográfica con una disolución de un 2,0 % en peso de albúmina de suero vacuno (firma Sigma Aldrich), un 0,5 % en peso de Brij® (firma Sigma Aldrich) y un 0,03 % en peso de hidróxido sódico en agua destilada (vellón A). Para evaluar el efecto de hidróxido sódico con el fin de una elaboración química de saliva se impregnó paralelamente una zona de una segunda tira de ensayo cromatográfica, formada por vellón, con una disolución de un 2,0 % en peso de albúmina de suero vacuno y un 0,5 % en peso de Brij® en agua destilada (vellón B).

10 A continuación se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de benzodiazepina diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de benzodiazepina de 20 ng/ml, 30 ng/ml, 50 ng/ml, o bien 100 ng/ml. Tras aplicación de 10 µl de esta saliva de zona de almacenamiento dotada sobre la superficie de limpieza de un elemento de limpieza comercial (firma Securetec Detektionssysteme) se puso en contacto el elemento de limpieza con la zona impregnada de ambas tiras de ensayo cromatográficas, y las tiras de ensayo se incubaron durante un intervalo de tiempo de 30 segundos a temperatura ambiente.

15 Tras incubación con la muestra de analito se sumergieron la tiras de ensayo en agua bidestilada, y de este modo se inició el proceso de cromatografía. El tiempo de desarrollo del ensayo completo ascendía a 5 hasta 10 minutos. Los resultados de las determinaciones están representados en la tabla 3.

Tabla 3

Concentración de benzodiazepina	Señal de línea de ensayo para benzodiazepina	
	Vellón A	Vellón B
20 ng/ml	Ligeramente positiva	Negativa
30 ng/ml	Positiva	Negativa
50 ng/ml	Positiva	Negativa
100 ng/ml	Positiva	Positiva

20 Como se desprende de la tabla 3, una impregnación del vellón con cantidades reducidas de hidróxido sódico conduce a un desarrollo de señal intensificado en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica, y con ello a una mejora de la identificación de benzodiazepina.

Ejemplo 7: empleo de vellones para el aumento de la sensibilidad y la especificidad

25 Para evaluar el efecto de diversos vellones con el fin de una elaboración mecánica de saliva se puso a disposición tiras de ensayo cromatográficas, que comprendían una zona formada por Sontara® 8423 (Firma DuPont), Ahlstrom 8964 (Firma Ahlstrom), Rapid 24Q (Firma Whatman), o bien FS 2216 (Firma Freudenberg), para la absorción de una muestra a investigar.

30 Se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de cocaína diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de cocaína de 5 ng/ml, 15 ng/ml, o bien 50 ng/ml. Tras aplicación de 10 µl de esta saliva de zona de almacenamiento dotada sobre la superficie de limpieza de un elemento de limpieza comercial (firma Securetec Detektionssysteme) se puso en contacto el elemento de limpieza con la zona formada por vellón de las tiras de ensayo cromatográficas, que contenía respectivamente un anticuerpo específico para cocaína, y las tiras de ensayo se incubaron durante un intervalo de tiempo de 60 segundos a temperatura ambiente.

35 Tras incubación con la muestra de analito se sumergieron la tiras de ensayo en agua bidestilada, y de este modo se inició el proceso de cromatografía. El tiempo de desarrollo del ensayo completo ascendía a 5 hasta 10 minutos. Los resultados de las determinaciones están representados en la tabla 4.

Tabla 4

Concentración de cocaína	Señal de línea de ensayo para cocaína			
	Sontara [®] 8423	Ahlstrom 8964	Rapid 24Q	FS 2216
5 ng/ml	Negativa	Ligeramente positiva	Ligeramente positiva	Ligeramente positiva
15 ng/ml	Ligeramente positiva	Positiva	Positiva	Positiva
50 ng/ml	Ligeramente positiva	Positiva	Positiva	Positiva

5 Como se desprende de la tabla 4, el empleo de vellón Ahlstrom 8964, de vellón Whatman Rapid 24Q, así como de vellón Freudenberg FS 2216, ya a una concentración de cocaína de 5 ng/ml, conduce a un desarrollo de señal intensificado en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica, y con ello a una mejora de la identificación de cocaína. Esto se puede atribuir esencialmente a que Ahlstrom 8964, Whatman Rapid 24Q y Freudenberg FS 2216 retienen los componentes de saliva sólidos, o bien viscosos, de modo especialmente conveniente por vía mecánica, y en este sentido muestran un comportamiento de cromatografía mejorado.

10 Ejemplo 8: influencia de la incubación de analito y componente de enlace específico para el analito sobre la sensibilidad

15 En el ámbito de un estudio clínico se extrajo una muestra de saliva de voluntarios consumidores de metadona, que habían tomado adicionalmente Δ^9 -THC como máximo 8 horas antes de la toma de muestras, y presentaban una boca muy seca, sin saliva evidentemente húmeda, por medio de un elemento de limpieza comercial (firma Securetec Detektionssysteme). Como control negativo sirvieron voluntarios que habían consumido Δ^9 -THC antes de la toma de muestras. Para la determinación del volumen de saliva absorbido en cada caso se pesó el elemento de limpieza antes y después de la toma de muestras.

20 Para evaluar el efecto de una incubación directa de analito y componente de enlace específico para el analito sobre la sensibilidad del procedimiento de identificación, en una primera serie de ensayos se pusieron en contacto los elementos de limpieza respectivamente con una zona formada por vellón de una tira de ensayo cromatográfica, como se da a conocer en el documento EP 0 699 906 A1 y EP 0 811 842 A2. Ya que las tiras de ensayo dadas a conocer en documentos anteriores no contienen componente de enlace específico para el enlace en la zona configurada para la absorción de la muestra, en ambos casos pueden entrar en contacto entre sí analito y componente de enlace específico para el analito solo tras el inicio de la cromatografía.

25 En una segunda serie de ensayos se puso en contacto los elementos de limpieza respectivamente con una zona formada por vellón de una tira de ensayo cromatográfica según la invención, que contenía un anticuerpo específico para Δ^9 -THC según el ejemplo 3 en la zona configurada para la absorción de la muestra, y las tiras de ensayo se incubaron durante un intervalo de tiempo de 60 segundos a temperatura ambiente. A continuación se sumergieron todas las tiras de ensayo respectivamente en agua bidestilada, y se inició el proceso cromatográfico. El tiempo de desarrollo de ensayo completo ascendía a 5 hasta 10 minutos. Los resultados se representan en la tabla 5.

30

Tabla 5

Número de voluntarios	Volumen de saliva [μl]	Señal de línea de ensayo con incubación	Señal de línea de ensayo sin incubación
1	2.1	Positiva	Positiva
2	1.4	Positiva	Negativa
3	1.0	Ligeramente positiva	Negativa
4	1.5	Positiva	Ligeramente positiva
5	0.8	Positiva	Negativa
6	1.1	Negativa	Negativa
7	1.2	Ligeramente positiva	Negativa
8	1.4	Positiva	Negativa
9	1.5	Ligeramente positiva	Negativa
10	2.0	Positiva	Positiva
11 (control negativo)	1.9	Negativa	Negativa
12 (control negativo)	1.4	Negativa	Negativa
13 (control negativo)	1.2	negativa	Negativa

5 Como se desprende de la tabla 5, mediante una incubación de 60 segundos de analito y componente de enlace específico para el analito, antes del comienzo del proceso cromatográfico, incluso en voluntarios con boca muy seca (valor medio de volumen de muestra en los controles positivos: 1,4 μ; desviación standard: 0,4 μl), se puede identificar un número de consumidores de Δ^9 -THC tres veces más elevado que en el caso de sistemas de ensayo convencionales, que no comprenden una incubación de analito y componente de enlace específico para el analito antes del inicio de la cromatografía.

10 Ejemplo 9: influencia del tiempo de incubación de analito y componente de enlace específico para el analito sobre la sensibilidad

Se ajustó saliva de zona de almacenamiento (mezcla de salivas de cinco personas) con una disolución de Δ^9 -THC diluida en metanol (firma Cerilliant) a una concentración de Δ^9 -THC de 200 ng/ml. A continuación se absorbieron 8 μl de esta saliva de zona de almacenamiento dotada con un elemento de limpieza comercial (firma Securetec Detektionssysteme).

15 A continuación se puso en contacto el elemento de limpieza obtenido de este modo, en dos series de ensayos durante un intervalo de tiempo de 10, 20, 40, 60, 100, o bien 180 segundos, con una zona formada por vellón de una tira de ensayo cromatográfica, empleándose en el ámbito de la primera serie de ensayos respectivamente tiras de ensayo cromatográficas que contenían un anticuerpo específico para Δ^9 -THC según ejemplo 3 en la zona configurada para la absorción de la muestra.

Paralelamente se llevó a cabo una segunda serie de ensayos bajo empleo de tiras de ensayo cromatográficas, que no contenían el anticuerpo específico para Δ^9 -THC según el ejemplo 3 en la zona configurada para la absorción de la muestra, sino en zonas separadas de la misma, de modo que solo en el transcurso de la cromatografía se realizó un contacto entre el analito y el componente de enlace específico para el analito.

- 5 A continuación se sumergieron todas las tiras de ensayo respectivamente en agua bidestilada, y se inició el proceso cromatográfico. El tiempo de desarrollo de ensayo completo ascendía a 5 hasta 10 minutos. Los resultados están representados en la tabla 6.

Tabla 6

Tiempo de incubación [sec]	Señal de línea de ensayo con anticuerpos específicos para Δ^9 -THC en la zona de absorción	Señal de línea de ensayo sin anticuerpos específicos para Δ^9 -THC en la zona de absorción
10	++	+
20	++	+
40	++	(+)
60	++	(+)
100	++	((+))
180	++	((+))

++ señal fuertemente positiva
+ señal positiva
(+) señal ligeramente positiva
((+)) señal positiva límite – transición a señal negativa

5 Como se desprende de la tabla 6, en el caso de tiras de ensayo cromatográficas que contienen el anticuerpo específico para Δ^9 -THC en la zona configurada para la absorción de la muestra, ya mediante una incubación de 10 segundos de analito y componente de enlace específico para el analito antes del comienzo de la cromatografía se consigue un fuerte desarrollo de señal en la línea de ensayo de la tira de ensayo cromatográfica. Simultáneamente es evidente que la intensidad de la señal de línea de ensayo no varía con tiempo de incubación ascendente.

10 Esto último se puede atribuir por una parte a que el analito forma un complejo con el componente de enlace específico para el analito inmediatamente tras puesta en contacto de elemento de limpieza y tira de ensayo cromatográfica, y por consiguiente no se enlaza, o se enlaza inespecíficamente al material de vellón de la tira de ensayo solo en una parte reducida. Por otra parte, con tiempo de incubación ascendente tampoco se muestra una intensificación de la señal de línea de ensayo, ya que la concentración de analito de 200 ng/ml, relativamente elevada, cubre el efecto positivo de un tiempo de incubación prolongado.

15 En la repetición de las anteriores series de ensayo bajo empleo de una concentración de Δ^9 -THC de 20 ng/ml se obtienen los resultados representados en la tabla 7.

Tabla 7

Tiempo de incubación [sec]	Señal de línea de ensayo con anticuerpos específicos para Δ^9 -THC en la zona de absorción	Señal de línea de ensayo sin anticuerpos específicos para Δ^9 -THC en la zona de absorción
10	((+))	-
20	(+)	-
40	(+)	-
60	+	-
100	++	-
180	++	-

++ señal fuertemente positiva
+ señal positiva
(+) señal ligeramente positiva
((+)) señal positiva límite – transición a señal negativa
- señal negativa

5 Como se desprende de la tabla 7, en el caso de tiras de ensayo cromatográficas que contienen el anticuerpo específico para Δ^9 -THC en la zona configurada para la absorción de la muestra, y posibilitan de este modo una incubación directa de analito y componente de enlace específico para el analito, se puede detectar Δ^9 -THC también en una concentración de únicamente 20 ng/ml ya tras un tiempo de incubación reducido.

10 Con aumento de tiempo de incubación aumenta la intensidad de la señal de línea de ensayo, alcanzándose la señal de línea de ensayo máxima a partir de un tiempo de incubación de 100 segundos. De la tabla 7 se desprende simultáneamente que, en el caso de variante de ensayo sin anticuerpos específicos para Δ^9 -THC en la zona de absorción de muestras de la tira de ensayo cromatográfica, no es posible la identificación de Δ^9 -THC en una concentración de 20 ng/ml.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la determinación de un analito, que comprende los pasos:

(a) puesta a disposición de un elemento de ensayo que comprende

(i) una primera zona que está configurada para la absorción de agente eluyente,

5 (ii) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos, y comprende un componente de enlace específico para los analitos,

(iii) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica del analito,

(iv) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente, y

(v) en caso dado una carcasa,

10 (b) absorción de una muestra que contiene los analitos por una superficie de muestra con un elemento de limpieza,

(c) puesta en contacto del elemento de limpieza con la segunda zona del elemento de ensayo durante un intervalo de tiempo de al menos 10 segundos, transfiriéndose al menos una parte de la muestra del elemento de limpieza al elemento de ensayo, y efectuándose una incubación de analito con el componente de enlace específico para el analito,

15

(d) puesta en contacto de la primera zona del elemento de ensayo incubado con un agente eluyente, y

(e) determinación de la presencia y/o de la cantidad de analito, comprendiendo el elemento de ensayo y/o el elemento de limpieza un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico.

20

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que se emplea como elemento de ensayo una tira de ensayo cromatográfica.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que se emplea como componente de enlace específico para el analito un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo funcional.

25 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se emplea un elemento de ensayo con una o con varias superficies de limpieza, poniéndose en contacto el elemento de limpieza y el elemento de ensayo entre sí en especial durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 60 segundos hasta aproximadamente 180 segundos.

30 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el elemento de ensayo comprende un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito seleccionada a partir del grupo constituido por un hidrato de carbono y un alcohol sacárico, y/o el elemento de limpieza de un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína y una mezcla de proteínas.

35

6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la segunda zona del elemento de ensayo comprende además un agente para la elaboración química o/y mecánica de la muestra que contiene los analitos, conteniendo el agente químico de elaboración de muestras en especial una sustancia seleccionada a partir del grupo constituido por un ácido, una base, un tampón, un disolvente orgánico y un detergente, y comprendiendo el agente mecánico de elaboración de muestras en especial un tejido o/y un vellón.

40

7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende una combinación de un formato de ensayo competitivo y un formato de ensayo no competitivo.

8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el analito se determina con una especificidad de al menos un 95 % o/y con una sensibilidad de al menos un 90 %.

45

- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que como analito se determina un estupefaciente, en especial una sustancia seleccionada a partir del grupo constituido por agentes disociativos, delirantes, empatógenos, contactógenos, hipnóticos, narcóticos, psicodélicos, sedantes y estimulantes.
- 5 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que se determinan varios analitos simultáneamente, en especial 2 a 20 analitos diferentes.
- 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que se emplea como muestra un fluido corporal, en especial sangre, orina o saliva.
- 10 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que se emplea una muestra con un volumen de aproximadamente 0,05 μl a aproximadamente 20 μl , en especial con un volumen de aproximadamente 0,1 μl a aproximadamente 5 μl .
- 13.- Elemento de ensayo para la determinación de un analito, que comprende:
- (i) una primera zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente,
 - (ii) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos, y comprende un componente de enlace específico para los analitos,
 - 15 (iii) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica de analito,
 - (iv) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente,
 - (v) en caso dado una carcasa, y
 - (vi) un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico.
- 20
- 14.- Empleo de un elemento de limpieza en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12 para la absorción de un analito de una superficie y para la transferencia del analito a un elemento de ensayo, comprendiendo el elemento de limpieza un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico.
- 25
- 15.- Kit para la determinación de un analito, que comprende:
- (a) un elemento de ensayo, que comprende
 - (i) una primera zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente,
 - (ii) una segunda zona, que está configurada para la aplicación de una muestra que contiene los analitos, y comprende un componente de enlace específico para los analitos,
 - 30 (iii) una tercera zona, que está configurada para la detección óptica de analito,
 - (iv) una cuarta zona, que está configurada para la absorción de agente eluyente excedente, y
 - (v) en caso dado una carcasa, y
 - (b) un elemento de limpieza que está configurado para la absorción de una muestra de analito,
- 35 comprendiendo el elemento de ensayo o/y el elemento de limpieza un reactivo de transferencia de analito, que contiene al menos una sustancia inespecífica para el analito, seleccionada a partir del grupo constituido por una proteína, una mezcla de proteínas, un hidrato de carbono y un alcohol sacárico.

Figura 1

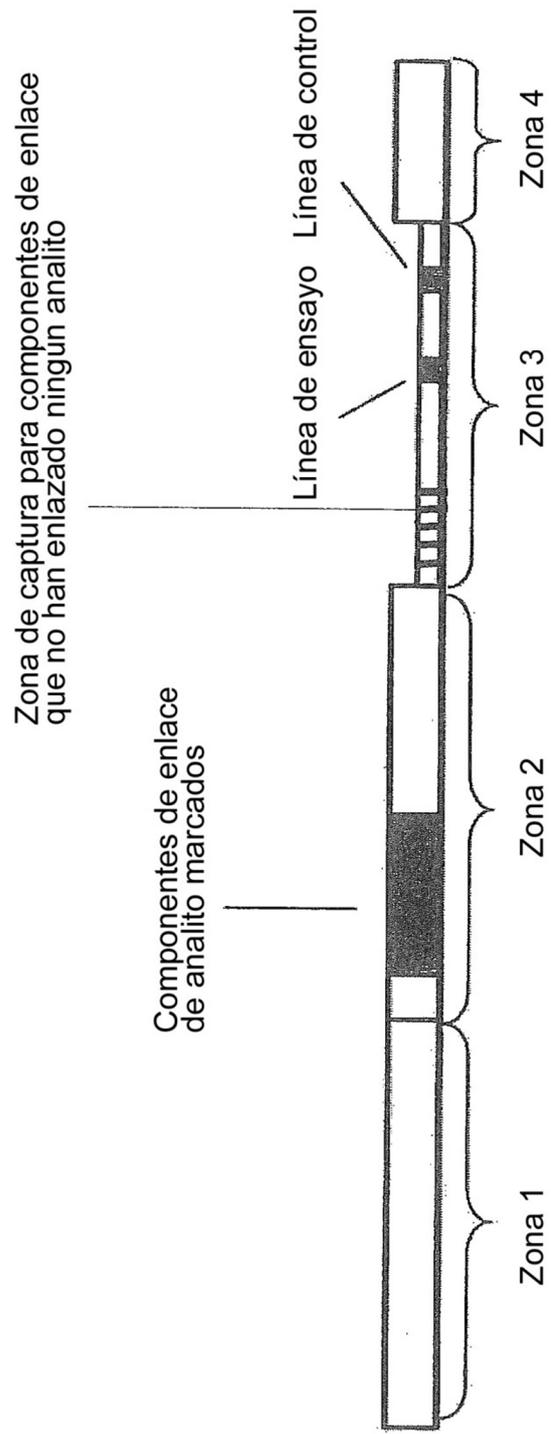


Figura 2

