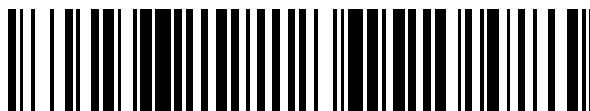


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 610**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/493 (2006.01)
G01N 33/84 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2006** **PCT/US2006/023828**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2007** **WO07001991**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2006** **E 06773551 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 1896834**

54 Título: **Método de detección de muestras adulteradas**

30 Prioridad:

23.06.2005 US 159944

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2019

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

BUKHTIYAROV, YURI;
BRIGGS, CATHEY, M. y
DUGGAN, LAURA, J.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 702 610 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

Método de detección de muestras adulteradas

Antecedentes

5 Esta invención se refiere a la determinación de drogas de abuso. En algunas realizaciones, la invención se refiere a mejorar la detección de adulterantes que pueden estar presentes en una muestra biológica para ser analizada en busca de drogas de abuso.

10 Dado que el uso de drogas ilícitas ha aumentado, ha crecido la preocupación pública por los problemas asociados con sus efectos. El uso de drogas es generalmente reconocido como un factor contribuyente significativo en el aumento actual de accidentes. Los empleadores, las organizaciones gubernamentales y otros utilizan cada vez más la detección de drogas y la ausencia de drogas como condiciones de empleo. Esta preocupación ha llevado a pruebas para drogas en el lugar de trabajo para identificar, tratar y eliminar a los usuarios activos de drogas de la fuerza laboral. Las pruebas para drogas iniciales en el lugar de trabajo revelaron la incursión intrusiva del uso y abuso de drogas en la vida diaria de una parte significativa de los estadounidenses. Investigaciones adicionales indicaron los costes asombrosos para la industria pública y privada en términos de pérdida de productividad, mayores costes de atención médica y sufrimiento humano y muerte debido al abuso de drogas. Como resultado, las pruebas para drogas se han extendido a todas las áreas del sector público y privado.

20 Debido a lo anterior, se puede solicitar o exigir a las personas que proporcionen una muestra, tal como una muestra de orina, que se analizará para detectar la presencia de drogas de abuso o metabolitos de drogas de abuso. Una prueba inicial o de detección se realiza primero con frecuencia. Un resultado positivo generalmente se confirma con un método diferente al utilizado para la prueba inicial, que generalmente tiene mayor sensibilidad y especificidad que la prueba inicial. Sin embargo, una prueba negativa inicial generalmente no es confirmada. Por lo tanto, una persona que teme un resultado positivo en una prueba de detección inicial puede alterar su muestra de orina para evitar la detección del fármaco o de metabolitos del fármaco.

25 Muchas pruebas de detección utilizan reacciones de antígeno-anticuerpo cuantificadas por medio de un indicador enzimático. Los ensayos de confirmación, por otro lado, son laboriosos y requieren mucho tiempo, altamente exactos, costosos y más difíciles de adulterar. Además, la criba positiva ya ha puesto una bandera roja, lo que llama la atención sobre la muestra. El análisis de confirmación utiliza pruebas de GC-MS (cromatografía de gases por espectrometría de masas) que se consideran el "estándar de oro" para los análisis de fármacos de manera científica y legal.

30 Un método para alterar una muestra de orina es diluir la muestra de modo que la concentración del fármaco o del metabolito del fármaco esté por debajo del umbral de detección en una prueba de detección. Por ejemplo, se puede agregar agua y/o solución salina a la muestra para diluir el medicamento o su metabolito a una concentración que se detecta con menos facilidad mediante la prueba de detección. Para detectar este tipo de alteración, la muestra de orina se analiza con frecuencia para determinar si los parámetros fisiológicos como la concentración de creatinina, el pH y la gravedad específica están dentro de los rangos normales, o si estos parámetros son anormales debido a la presencia de diluyente.

35 Se pueden agregar adulterantes químicos a una muestra en un intento de producir un resultado falso negativo en la prueba de detección inicial. En algunos casos, los adulterantes químicos convierten químicamente un fármaco o un metabolito de fármaco en un producto menos detectable o no detectable. Las técnicas de adulteración se pueden dividir en dos tipos distintos. El primero utiliza una técnica "in vivo" en la que el usuario consume el adulterante. La segunda técnica utiliza un método "in vitro" en el cual el abusador agrega el adulterante directamente a la muestra de orina presentada para la prueba.

45 Los métodos in vitro utilizan numerosos productos y compuestos que afectarán negativamente el proceso de criba o confirmación. Los productos que afectan el proceso de criba incluyen muchos productos para el hogar y también productos disponibles en el mercado que se venden con el propósito de ocultar el resultado de una prueba para drogas. Estos productos incluyen oxidantes tales como, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, nitrito de sodio, bromatos tales como, por ejemplo, bromato de sodio, bromato de potasio, etc., bromo, lejía (hipoclorito de sodio), cromatos tales como, por ejemplo, clorocromato de piridinio, etc., nitritos, yodo, yodato, ácido yódico, peryodato, y similares.

50 La presencia de adulterantes químicos es más difícil de evaluar, ya que se deben realizar pruebas para los agentes químicos específicos. A medida que se reconoce e identifica cada nuevo adulterante químico, se desarrollan pruebas para la identificación del adulterante específico. Sin embargo, con el desarrollo de múltiples adulterantes, cada uno de los cuales es químicamente distinto y cada uno de los cuales es capaz de destruir o enmascarar drogas de abuso o sus metabolitos, el proceso de identificación de muestras de orina adulteradas se vuelve cada vez más difícil. Se deben realizar múltiples pruebas en cada muestra para asegurar la detección de todas las muestras adulteradas químicamente. Además, hay un período de tiempo para cada adulterante durante el cual las muestras que contienen ese adulterante no se detectan porque el adulterante específico de la prueba aún no ha sido identificado y/o confirmado.

La adulteración de la muestra puede afectar a muchos de los métodos comúnmente utilizados para la detección de drogas de abuso como, por ejemplo, inmunoensayo enzimático (EMIT o EIA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA), etc. En consecuencia, la bibliografía de química clínica recomienda, y los SAMSHA Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs requieren ahora, que las pruebas para drogas de abuso en muestras de orina incluyan pruebas de adulterantes para identificar muestras de orina que hayan sido adulteradas.

Se han desarrollado diversas composiciones y métodos para detectar uno o más de un grupo de adulterantes que se agregan a muestras biológicas como la orina para prevenir la detección de drogas de abuso. Ejemplos de tales composiciones incluyen agentes cromóforos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, diaminobenzidina, 3-amino-9-etilcarbazona, 4-cloro-1-naftol, 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), orto-fenilen-diamina, etc.)

Existe la necesidad de mejorar la detección de adulterantes en muestras para el análisis de drogas de abuso. En particular, existe la necesidad de aumentar la sensibilidad de las composiciones usadas para la detección de adulterantes. La detección mejorada de adulterantes debe realizarse tanto para procesos manuales como automáticos.

Resumen de realizaciones de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar un adulterante en una muestra biológica. En un medio de ensayo se proporciona una combinación de una muestra biológica, un agente para detectar el adulterante y una unidad estructural iónica capaz de experimentar reducción mediante la obtención de electrones. La combinación se incuba bajo condiciones suficientes para que la unidad estructural iónica sufra reducción y para que el agente para detectar el adulterante interactúe con el adulterante. La reducción de la unidad estructural iónica mejora la detección del adulterante como resultado del aumento de la sensibilidad del agente para detectar el adulterante. Se mide el grado de interacción entre el agente para detectar el adulterante y el adulterante. La extensión de la interacción está relacionada con la presencia o ausencia del adulterante en la muestra biológica. El método de la presente invención se define en la reivindicación 1.

En el método de la invención se proporciona una combinación que comprende una muestra biológica, un compuesto cromogénico y una fuente de iones férricos en un medio de ensayo. La combinación se incuba en condiciones suficientes para que los iones férricos experimenten una reducción a los iones ferrosos y para que el compuesto cromogénico interactúe con el adulterante oxidante. Se determina el grado de interacción entre el compuesto cromogénico y el adulterante oxidante y el grado se relaciona con la presencia o ausencia del adulterante oxidante en la muestra biológica.

Breve descripción de los dibujos

Las siguientes figuras se incluyen para ilustrar mejor las realizaciones del aparato y la técnica de la presente invención. Las figuras no están a escala y algunas características pueden ser exageradas con el propósito de ilustrar ciertos aspectos o realizaciones de la presente invención.

La Figura 1 es un esquema que representa una realización de un dispositivo para llevar a cabo el método de la presente invención.

Descripción de realizaciones específicas

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese rango establecido, se engloba dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

Las realizaciones de los presentes métodos se emplean junto con el examen de muestras biológicas para detectar la presencia de una o más drogas de abuso cuando existe un interés en determinar si la muestra biológica ha sido adulterada. Una unidad estructural iónica que es capaz de experimentar reducción se usa para aumentar la sensibilidad de un agente para detectar la presencia de un adulterante en la muestra biológica.

Los términos "drogas de abuso" o "analito" incluyen las drogas mismas y sus metabolitos y similares, y pueden incluir medicamentos terapéuticos que de otro modo son legales pero que son mal utilizados. Las drogas de abuso tienen

generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000 de peso molecular, o de aproximadamente 125 a aproximadamente 1000 de peso molecular. Drogas de abuso representativas (incluidas las drogas utilizadas indebidamente), a modo de ejemplo y sin limitación, incluyen (i) alcaloides como los alcaloides de morfina, que incluyen morfina, codeína, heroína, dextrometorfano, sus derivados y metabolitos; alcaloides de cocaína, que incluyen cocaína y benzoilecgonina, sus derivados y metabolitos; alcaloides del ergot, que incluyen la dietilamida del ácido lisérgico; alcaloides esteroides; alcaloides de iminazoilo; alcaloides de quinazolina; alcaloides de isoquinolina; alcaloides de quinolina, que incluyen quinina y quinidina; alcaloides diterpénicos, sus derivados y metabolitos; (ii) esteroides, que incluyen los estrógenos, andrógenos, esteroides andrenocorticales, ácidos biliares, glucósidos cardiotónicos y agliconas, que incluyen digoxina y digoxigenina, saponinas y sapogeninas, sus derivados y metabolitos; sustancias miméticas esteroides, tales como dietilestilbestrol; (iii) lactamas que tienen de 5 a 6 miembros de anillo, que incluyen los barbitúricos, por ejemplo, fenobarbital y secobarbital, difenilhidantoína, primidona, etosuximida y sus metabolitos; (iv) aminoalquilbencenos, con alquilo de 2 a 3 átomos de carbono, que incluyen las anfetaminas; catecolaminas, que incluyen efedrina, L-dopa, epinefrina; narceína papaverina; y metabolitos de los anteriores; (v) benzheterocíclicos que incluyen oxazepam, clorpromazina, tegretol, sus derivados y metabolitos, los anillos heterocíclicos que son azepinas, diazepinas y fenotiazinas; (vi) purinas, que incluyen teofilina, cafeína, sus metabolitos y derivados; (vii) drogas derivadas de la marihuana, que incluyen cannabinal y tetrahidrocannabinal; (viii) hormonas tales como tiroxina, cortisol, triyodotironina, testosterona, estradiol, estrona, progesterona, (ix) antidepresivos tricíclicos, que incluyen imipramina, dismetilimipramina, amitriptilinas, retroportina y (x) antineoplásicos, que incluyen metotrexato; y similares.

El analito puede ser una molécula que se encuentra directamente en una muestra, como una muestra biológica, cuyo término incluye fluidos corporales o tejido de un huésped. La muestra se puede examinar directamente o se puede tratar previamente para hacer que el analito sea más fácilmente detectable eliminando los materiales no deseados. La muestra puede pretratarse para separar o lisar células; precipitar, hidrolizar o desnaturalizar proteínas; hidrolizar los lípidos; solubilizar el analito; o similares. Dicho tratamiento previo puede incluir, sin limitación: centrifugación; tratamiento de la muestra con un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol, como el metanol; y tratamiento con detergentes. La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente, que no interfiera con un ensayo. Se prefiere un medio acuoso.

La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico como, por ejemplo, líquido corporal, tejido y similares, que se obtiene del cuerpo de un mamífero y se sospecha que contiene una o más drogas de abuso. Los fluidos corporales incluyen, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, líquido intersticial, sudor, saliva, orina, semen, líquido de ampollas, exudados inflamatorios, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, líquido linfático, moco vaginal y similares. El tejido biológico incluye tejido extirpado de un órgano u otra parte del cuerpo de un huésped, por ejemplo, biopsias de tejido; pelo y piel; etcétera.

Los adulterantes mencionados anteriormente incluyen cualquier sustancia (o combinación de las mismas) que se puede agregar a la muestra biológica para ser analizada por adición directa o por adición indirecta, como por ingestión y similares. La sustancia se agrega a la muestra biológica para afectar adversamente un ensayo de detección o un proceso de confirmación. Tales sustancias incluyen muchos productos para el hogar y también productos disponibles comercialmente vendidos con el propósito de ocultar el resultado de una prueba para drogas. La sustancia puede ser un adulterante u oxidante a base de oxidación tal como, por ejemplo, un nitrito tal como, por ejemplo, nitrito de sodio, etc., un bromato tal como, por ejemplo, bromato de sodio, bromato de potasio, etc., bromo, lejía (hipoclorito de sodio), un cromato tal como, por ejemplo, clorocromato de piridinio (cromo VI), etc., un peróxido, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, etc., ya sea solo o junto con una enzima peroxidasa, un compuesto que contiene yodo como, por ejemplo, por ejemplo, yodo, yodato, por ejemplo, yodato de sodio, etc., ácido yódico, peryodato, por ejemplo, peryodato de sodio, etc., y similares. Muchas de las sustancias anteriores son agentes oxidantes relativamente fuertes y son el ingrediente activo en muchos productos comerciales que se venden específicamente con el fin de adulterar muestras biológicas.

Otros adulterantes a los que los presentes métodos pueden encontrar aplicación, aparte de una prueba general de oxidante, incluyen, por ejemplo, la mejora de una prueba para un oxidante específico tal como, por ejemplo, lejía o nitrito, y similares.

La cantidad de adulterante que puede haber en una muestra biológica generalmente es la que es agregada por una fuente externa directa o indirectamente como se discutió anteriormente. La cantidad de adulterante depende de la naturaleza del adulterante, la naturaleza de la muestra biológica, la naturaleza del ensayo que se usa para detectar la droga de abuso, etc. La cantidad de adulterante agregado generalmente es al menos la que es suficiente para hacer que un análisis de una droga de abuso sea ineficaz para detectar la droga de abuso y puede ser mayor pero no tan grande como para hacer que el adulterante sea fácilmente detectable por inspección visual u otra inspección. En general, la cantidad de adulterante en la muestra biológica puede variar enormemente dependiendo de cuánto agregue un individuo a la muestra; pero, en general, tal individuo solo querría agregar suficiente adulterante para hacer que la criba inicial sea negativa y no lo suficiente para cambiar la apariencia física o el olor de la muestra. Obviamente, la cantidad de adulterante en el medio de ensayo depende de la cantidad en la muestra biológica, que puede ser diluida por componentes adicionales del medio de ensayo.

Se han desarrollado diversos agentes para detectar adulterantes. Tales agentes incluyen, por ejemplo, compuestos cromogénicos, y similares, que se someten más fácilmente a la automatización. La detección también puede ocurrir mediante la medición de propiedades físicas como, por ejemplo, el pH, la gravedad específica y similares.

Como se mencionó anteriormente, un grupo de agentes para detectar adulterantes incluye compuestos cromogénicos que pueden ser oxidados por el adulterante para producir un producto detectable por inspección visual u otra inspección, generalmente, un producto coloreado. La expresión "que pueden ser" significa que la sustancia en particular se someterá a la operación citada si están presentes las condiciones para la operación. Por ejemplo, capaz de ser oxidada significa que la sustancia sufrirá oxidación a un nivel detectable cuando el adulterante esté presente. Ejemplos de compuestos cromogénicos incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS); 3-amino-9-etilcarbazona; naftoles tales como, por ejemplo, 4-cloro-1-naftol, y similares; indicadores cromogénicos de fenilamina tales como, por ejemplo, N,N,N,N-tetrametil-1,4-fenilendiamina, N,N-dietil-1,4-fenilendiamina, 2,3,5,6-tetrametil-1,4-fenilendiamina, N,N-dimetil-p-fenilendiamina, 2,4,6-trimetil-1,3-fenilendiamina, N,N,N,N-tetrametilbencidina, 3,3,5,5-tetrametilbencidina, N,N,N,N-tetrametil-4,4-diaminestilbeno, diamina-bencidina, orto-fenilendiamina y O-toluidina, etc. Ejemplos particulares de composiciones cromogénicas para la detección de adulterantes se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos No. 6,503,726 (Anne, et al.), y en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20030138959 (Carter, et al.), cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia.

La cantidad de agente para detectar un adulterante es aquella que es suficiente para hacer que un ensayo para el adulterante sea efectivo en, o suficiente para, detectar el adulterante y depende de la naturaleza del agente, la naturaleza del adulterante, la naturaleza de la muestra biológica, composición de la muestra como resultado de la salud del individuo y cualquier medicamento o vitamina que puedan ingerir, y así sucesivamente. En general, la cantidad de agente para detectar un adulterante en el medio de ensayo es variable dependiendo del potencial redox del propio agente. En muchos casos, la cantidad de agente empleado para detectar un adulterante es especificada por el fabricante del producto que comprende el agente.

Como se mencionó anteriormente, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se incluye una unidad estructural iónica capaz de experimentar reducción al ganar electrones en un medio que comprende la muestra biológica y el agente para detectar el adulterante. La naturaleza de la unidad estructural iónica está relacionada con la naturaleza del agente para detectar el adulterante. La unidad estructural iónica no debe afectar de manera significativa la actividad del agente para detectar el adulterante. La unidad estructural iónica es particularmente eficaz para mejorar la sensibilidad de los agentes para detectar adulterantes basados en oxidación. En algunas realizaciones, la unidad estructural iónica es un ion metálico de un metal tal como, por ejemplo, un metal del Grupo VIII, un metal del Grupo VIIIB, un metal del Grupo IB, y similares. Por ejemplo, los metales incluyen hierro, plata, cobre, manganeso, níquel, platino, etc. Ejemplos de iones metálicos adecuados incluyen férrico, plata (+1), cúprico, manganeso (+4), níquel (+2 y +4), platino (+4) y similares. Por ejemplo, el ion férrico es capaz de ganar electrones para pasar del estado Fe^{+3} al estado Fe^{+2} .

El ion metálico suele estar presente con un coión, que no debería afectar de manera significativa la actividad del agente para detectar el adulterante. El coión no debe ser un adulterante. Ejemplos de coiones adecuados incluyen, por ejemplo, cloruro, sulfato, bromuro, fluoruro, yoduro, óxido y similares. La unidad estructural iónica y su coión pueden estar presentes en estado seco o en solución, generalmente en un medio acuoso. Si está presente en la solución, la cantidad de la unidad estructural iónica es suficiente para que, cuando la solución se agregue a un medio de ensayo o se convierta en un medio de ensayo, la unidad estructural iónica esté presente en la cantidad o concentración deseada de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

La cantidad de unidad estructural iónica es la que es suficiente para aumentar la sensibilidad del agente para detectar el adulterante y depende de la naturaleza del agente, la naturaleza del adulterante, la naturaleza de la muestra biológica, etc. La cantidad de la unidad estructural iónica se determina generalmente sobre una base empírica. En general, la cantidad de unidad estructural iónica en el medio de ensayo es pequeña en comparación con la concentración de la porción cromogénica del ensayo. Como ejemplo de uso del ion férrico con fines ilustrativos y no limitativos, en muchas realizaciones, la concentración del ion férrico en el medio de ensayo resultante (es decir, después de la adición del ion férrico como un reactivo sólido o líquido) es de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 1 a aproximadamente 30 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$, y así sucesivamente.

En algunas realizaciones, la unidad estructural iónica se proporciona como un reactivo separado en un medio líquido adecuado o en estado seco. Pueden emplearse diversos reguladores para ayudar a mantener un pH para mejorar la solubilidad de la unidad estructural iónica en un medio acuoso, que puede ser similar al medio acuoso descrito anteriormente para el medio de ensayo. La naturaleza del regulador dependerá de la naturaleza de la unidad estructural iónica, incluidos sus requisitos de solubilidad. También pueden estar presentes otros materiales con la unidad estructural iónica, tales como materiales que previenen las manchas y similares. Por ejemplo, el dodecil sulfato de sodio puede emplearse a una concentración que reduce o elimina la tinción de los recipientes de reacción de ensayo, de modo que los recipientes pueden reutilizarse después de un lavado adecuado.

- El examen de la muestra biológica para detectar la presencia del adulterante se realiza generalmente en un medio de ensayo, que puede ser un medio que sea el mismo o sea diferente al mismo, para el análisis de detección de la droga. En algunas realizaciones, la muestra biológica proporciona el medio de ensayo, que se pone en contacto con un medio de ensayo que comprende el agente para detectar un adulterante, se añaden una unidad estructural iónica, reguladores y similares. Pueden añadirse diversos reguladores a la muestra biológica para ajustar el pH y similares. En algunas realizaciones, el medio de ensayo es un medio acuoso tamponado al que se añaden la muestra biológica y otros agentes. El pH del medio de ensayo es bajo a moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir de 0.1 a aproximadamente 40 por ciento en volumen de un codisolvente tal como, por ejemplo, un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol, un éter y similares. El pH para el medio estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 11, aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5. El pH generalmente será un compromiso entre lo que es óptimo para provocar la interacción entre el agente para detectar el adulterante y el adulterante y la reducción de la unidad estructural iónica, y así sucesivamente.
- Se pueden usar diversos reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbitol y similares. El regulador particular empleado no es crítico para esta invención, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de los reguladores, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Con frecuencia, además de estos aditivos, se pueden incluir proteínas, como las albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares.
- Como se mencionó anteriormente, una combinación de la muestra biológica, de la que se sospecha que contiene un adulterante, un agente para detectar un adulterante, y la unidad estructural iónica, se forma en un medio de ensayo. Si bien el orden de adición puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más simple es agregar todos los materiales simultáneamente y examinar el medio para detectar la presencia de una señal que indique la presencia del adulterante en la muestra biológica. Alternativamente, los reactivos pueden combinarse secuencialmente. Opcionalmente, se puede involucrar un paso de incubación posterior a cada adición como se discutió anteriormente.
- La combinación se incuba en condiciones suficientes para que la unidad estructural iónica sufra una reducción y para que el agente para detectar el adulterante interactúe con el adulterante. Se pueden aplicar uno o más períodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluidos los intervalos entre la adición de los diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio generalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que ocurran las diversas interacciones. Se emplean normalmente temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y, generalmente, temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el período de la medición. Las temperaturas de incubación varían de aproximadamente 5° a aproximadamente 99°C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70°C, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos. El período de tiempo depende de la temperatura del medio, la velocidad de las diversas interacciones, etc. Las temperaturas durante las mediciones generalmente oscilarán entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50°C, desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 40°C.
- La naturaleza de la señal que se observa depende de la naturaleza del agente para detectar un adulterante. Para las composiciones cromogénicas, la señal suele ser un color detectable visual o instrumentalmente o ambos. Por ejemplo, pueden emplearse instrumentos clínicos que se emplean actualmente para medir la formación de color en ensayos realizados en laboratorios clínicos. El nivel de la señal detectada está relacionado con la presencia del adulterante en la muestra biológica. En general, se establece un nivel de corte predeterminado para el adulterante. El nivel de corte predeterminado particular generalmente se determina sobre una base de adulterante por adulterante. Los expertos en la técnica conocen bien los factores relacionados con la selección de niveles de corte predeterminados. Por lo general, el nivel de corte predeterminado depende de la cantidad más pequeña de adulterante que sea necesaria para que el análisis de una droga de abuso sea inefectivo.
- El formato para llevar a cabo la determinación de un adulterante de acuerdo con realizaciones de los presentes métodos depende de la naturaleza del adulterante, la naturaleza del agente para detectar el adulterante, la naturaleza de la unidad estructural iónica, la naturaleza de la muestra y así sucesivamente. El ensayo puede llevarse a cabo en un recipiente de reacción tal como, por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación, una cubeta, un tubo de ensayo, un instrumento automatizado que puede procesar muestras y similares. En algunas realizaciones, los reactivos pueden simplemente agregarse al recipiente de reacción junto con la muestra biológica y luego se examina el medio para detectar la presencia y/o la cantidad de una señal.
- Una realización de un dispositivo de prueba para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención se muestra en la Figura 1. El dispositivo 10 de prueba comprende una almohadilla 12 porosa fijada a una tira 14 de plástico. La almohadilla 12 está impregnada con un agente para detectar un adulterante 16 y con una unidad 18 estructural iónica.

Uso de realizaciones

Se pueden utilizar realizaciones de la presente invención junto con muchos ensayos conocidos de drogas de abuso. Los métodos de ensayo generalmente involucran una muestra biológica, que se combina en un medio de ensayo con reactivos para llevar a cabo el ensayo. Dichos reactivos pueden incluir un asociado de unión para el analito tal como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito, análogos de analito, superficies sólidas a las que se une uno de los reactivos anteriores, asociados de unión para asociados de unión y así sucesivamente. Uno o más de los reactivos se pueden marcar con una etiqueta tal como, por ejemplo, una enzima. Los reactivos se eligen de manera que se obtenga una señal de una etiqueta en relación con la presencia o la cantidad de analito en la muestra. Los ensayos pueden realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Dade Behring Inc.) descrito en Rubenstein, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,817,837; métodos de inmunofluorescencia tales como los descritos en Ullman, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,996,345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") como los descritos en Maggio et al., Patente de Estados Unidos No. 4,233,402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se describe, por ejemplo, en, entre otros, la Patente de Estados Unidos No. 5,354,693; Etcétera.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por un módulo enzimático ("EMMIA") discutido por Ngo and Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia marcado con sustrato ("SLFIA") descrito por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904; los inmunoensayos de donantes de enzimas combinados ("CEDIA") revelados por Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240; inmunoensayos homogéneos marcados con partículas, tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada por partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

Ejemplos de ensayos heterogéneos son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA") discutido en Maggio, E.T. *supra*; el radioinmunoensayo, descrito en Yalow, et al., J. Clin. Invest. 39:1157 (1960) y así sucesivamente. Las realizaciones de la presente invención también pueden utilizarse junto con inmunoensayos de múltiples analitos en los que hay presentes uno o más fármacos de abuso. Dichos sistemas de múltiples analitos se describen, por ejemplo, en Loo, et al., J. Anal. Toxicol. 12:299 (1988).

Como se mencionó anteriormente, después de realizar un ensayo de criba inicial, las muestras biológicas que dan resultados positivos se someten a un ensayo de confirmación, como, por ejemplo, GC-MS para verificar los resultados de un análisis positivo de drogas de abuso. El análisis GC-MS cuesta muchas veces más que una criba inicial. Cada GC-MS adicional innecesario realizado aumenta el coste general de las pruebas para drogas. Eliminar estos ensayos adicionales e innecesarios ahorra millones de dólares por año. Como resultado de realizar un ensayo para un adulterante de acuerdo con realizaciones de la presente invención, se pueden ahorrar tiempo y reactivos innecesarios. Las pruebas pueden interrumpirse tan pronto como se detecte la presencia del adulterante. La capacidad de terminar el proceso de criba al determinar la presencia de un adulterante reduce los esfuerzos y el tiempo de técnico, lo que proporciona un ahorro económico al laboratorio de pruebas. Además, la interrupción temprana y el cese del proceso de criba automatizado pueden facilitar la recuperación temprana de una muestra biológica sustituta de la persona a la que se realiza la prueba, lo que proporciona determinaciones más precisas al solicitante de la prueba.

Además, las pruebas falsas positivas de detección de drogas tienen un gran impacto en las pruebas en el sitio. En la mayoría de las situaciones que utilizan pruebas en el sitio (los dispositivos en el sitio, como la varilla o los dispositivos de flujo lateral, no requieren instrumentación, lo que hace que estos dispositivos sean ideales para la recolección y en las instalaciones del sitio) el empleado es evaluado a su llegada para el trabajo. Si se obtiene un resultado positivo utilizando la prueba en el sitio, se envía una segunda muestra al laboratorio para la confirmación por GC-MS y el empleado es suspendido del trabajo o reasignado a otras tareas hasta que se conozcan los resultados de la prueba. Por lo tanto, es de vital importancia que el empleador y el laboratorio sepan si a la muestra se ha agregado un adulterante, para ahorrar tiempo, dinero, etc.

La invención se demuestra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos ilustrativos.

Ejemplos

Las partes y porcentajes en este documento están en peso, a menos que se indique lo contrario. Las temperaturas están en grados centígrados (°C). Todos los materiales fueron de Sigma-Aldrich, Saint Louis MO, a menos que se indique lo contrario.

Materiales: El reactivo 1 (agente para la detección de un adulterante) contenía 0.42 g/L de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal de diamonio, en glicina-HCl 50 mM a pH 2.1 con 0.01% de dodecil sulfato de sodio (SDS). El reactivo 2 (de acuerdo con algunas realizaciones de la invención) contenía 12.2 µg/mL de cloruro férrico en glicina-HCl 50 mM a pH 2.1 con SDS al 0.01%. Se mezclaron 247 µL de Reactivo 1 con 103 µL de Reactivo 2 y 5 µL de muestra, que se prepararon a las concentraciones de prueba apropiadas como se muestra en la tabla a continuación. La mezcla se incubó a 37°C durante 13 minutos y la absorbancia se midió a 700 nm utilizando un HITACHI 717 (Roche-Hitachi, Indianapolis IN).

ES 2 702 610 T3

El reactivo OX PERFECT® usado para comparación fue un reactivo comercial vendido por Dade Behring Inc., Newark DE. Se siguieron los parámetros y recomendaciones en el prospecto para usar el reactivo.

- 5 Todos los adulterantes se prepararon como soluciones madre en medio acuoso. PCC es clorocromato de piridinio. Ambos métodos se calibraron con 2.5 mg/dL de dicromato de sodio. El límite de detección se definió como el umbral por debajo del cual la sustancia de prueba produjo una absorbancia menor que la absorbancia de 2.5 mg/dL de solución de dicromato de sodio.

La prueba se realizó con el HITACHI 717. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Adulterante	Límite de detección (mg/dL) con kit oX Perfect	Límite de detección (mg/dL) con ion férrico
Yodato	130	60
Ácido yódico	50	55
Yodo	20	18
Peryodato	15	8
Dicromato	2.5	2.5
Peróxido	10	4
Blanqueador	4	4
PCC	5	5
Nitrito	1	1

- 10 Los resultados muestran que el uso de ion férrico mejoró el límite de detección del adulterante. Debe tenerse en cuenta que los resultados para el reactivo OX PERFECT son los mejores resultados obtenidos de múltiples ejecuciones y diferentes lotes de reactivos. En consecuencia, para algunos adulterantes no se observó una mejora en el límite de detección sobre el reactivo comercial a la concentración de ion férrico utilizada.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un adulterante oxidante en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio de reacción una muestra biológica, un compuesto cromogénico y una fuente de iones férricos,
- 5 (b) incubar la combinación en condiciones suficientes para que los iones férricos experimenten una reducción a iones ferrosos y para que el compuesto cromogénico reaccione con el adulterante oxidante, y
- (c) determinar el grado de reacción entre el compuesto cromogénico y el adulterante oxidante, en donde el grado de la misma está relacionado con la presencia o ausencia del adulterante oxidante en la muestra biológica.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto cromogénico es un sustrato para una peroxidasa.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto cromogénico se selecciona del grupo que consiste en ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazona, 4-cloro-1-naftol y orto-fenilen-diamina.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el adulterante oxidante se selecciona del grupo que consiste en peróxido, yodato, peryodato, cromato, nitrito, yodo, ácido yódico y lejía.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde la muestra biológica es orina.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5, en donde la determinación implica un dispositivo de prueba que comprende el compuesto cromogénico.
- 20 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde el dispositivo de prueba comprende una tira, placa, pocillo, cubeta, tubo de ensayo o dispositivo automático para procesar muestras clínicas.

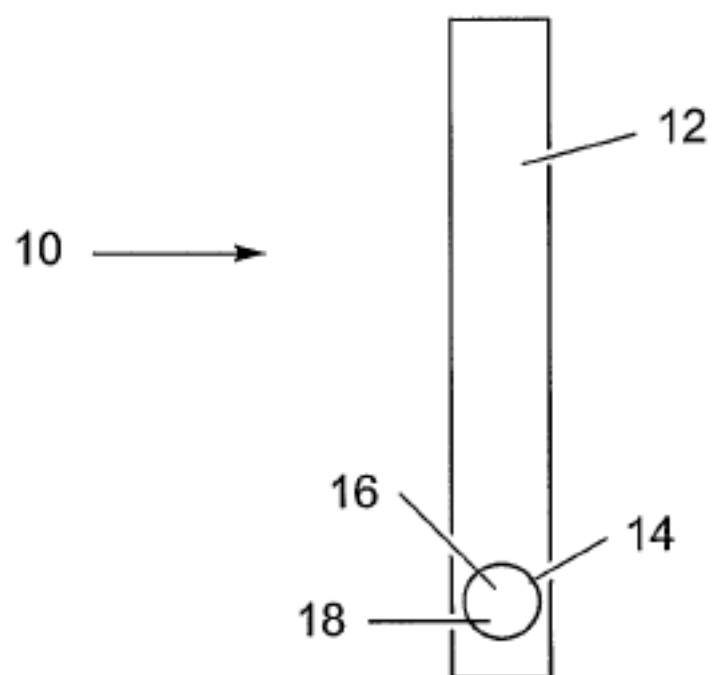


FIG. 1