



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 070**

51 Int. Cl.:
B01D 25/21 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04774921 .3**
96 Fecha de presentación : **03.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1667780**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **Método de detección de analitos múltiples.**

30 Prioridad: **03.09.2003 EP 03077782**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **CEDI Diagnostics B.V.**
Edelhertweg 15
8219 PH Lelystad, NL

72 Inventor/es: **Keizer, Gerrit, Dirk y**
Schielen, Wilhelmus, Joseph, Gerardus

74 Agente: **Molinero Zofío, Félix**

ES 2 313 070 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 analitos múltiples.

5 La presente invención se refiere a un método rápido y efectivo en términos de su costo para la detección de analitos en una muestra. En particular, la presente invención se refiere a una placa de microtitulación, cuyo fondo comprende un filtro de membrana semipermeable y al uso del mismo para la detección simultánea de múltiples analitos (sustancias constituyentes de una muestra sometida a análisis) en una muestra de fluido.

10 El uso del Ensayo de Enzimas Ligadas a Inmunosorbentes (ELISA, por las siglas de su expresión inglesa, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para la detección y cuantificación de analitos específicos, tales como anticuerpos o antígenos, es una metodología de diagnóstico bien estandarizada. En la actualidad tales métodos se realizan de manera rutinaria utilizando placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos. El método comprende un número de pasos esenciales que incluyen i) la inmovilización de un ligando de captura a las paredes del pocillo de la placa de microtitulación (el paso denominado de recubrimiento), ii) la separación de ligandos de captura enlazados y libres mediante lavados, iii) el enlace de un analito de interés al ligando de captura enlazado, iv) la separación de analitos enlazados y libres mediante lavados, v) el enlace de una enzima conjugada al analito enlazado, vi) la separación de conjugado enlazado y libre mediante lavados, y vii) la detección de conjugado enlazado mediante conversión enzimática de un sustrato añadido. Debido a estos pasos esenciales del proceso, y particularmente a los extensos procedimientos de lavado necesarios para separar reactantes enlazados de los no enlazados, el método es laborioso y relativamente lento.

25 Aparte del hecho de que los procesos de difusión están implicados en las diversas reacciones de enlace, retardando por tanto el procedimiento, el gran número de pasos de lavado crea grandes cantidades de fluidos de desecho. Esto es particularmente problemático cuando se utilizan materiales de riesgo biológico o muestras infecciosas y crea grandes cantidades de fluidos de desecho contaminados.

30 Es más, para poder llevar a cabo exámenes con respecto a múltiples analitos presentes en una muestra, deben revestirse placas de microtitulación independientes con ligandos de captura específicos, capaces de enlazar específicamente los analitos individuales a ser determinados. Por tanto, debe aplicarse una muestra a diferentes placas. Las placas independientes se requieren también porque el recubrimiento difiere de ligando de captura a ligando de captura (e. g. búferes diferentes, tiempos de incubación, temperaturas de incubación, etc.). Adicionalmente se requieren placas independientes debido a que el recubrimiento de pocillos individuales en una placa con ligandos de captura expresos alberga el riesgo de contaminación cruzada entre pocillos.

35 En muchos campos de diagnóstico, se examina una muestra individual en busca de la presencia o ausencia de un número de analitos. Cuando se detecta un gran número de diferentes analitos en muestras mediante el ELISA, el requerimiento antes descrito con respecto a placas de microtitulación independientes para cada prueba ELISA individual implica diversas desventajas. Por ejemplo, un gran número de pocillos de una placa de microtitulación puede quedar sin uso en los casos en que se examine solo un número limitado de muestras. También, las muestras a examen deben ser distribuidas a partes iguales en diferentes placas de examen en caso que en ellas deban determinarse diferentes analitos, necesitando por tanto volúmenes de muestra relativamente grandes. Es más, los resultados de diferentes placas son inherentemente difíciles de comparar. Como se señaló anteriormente, otro problema que tienen los métodos de la técnica anterior radica en que se requieren grandes volúmenes de fluidos de lavado y que en caso de detección de agentes infecciosos, surgen grandes cantidades de fluidos de desecho contaminados. Cuando se procesa de manera secuenciada el procedimiento consume mucho tiempo y es susceptible a error.

50 La Patente de los EE. UU. 2003/0 113 713 presenta un método para conducir múltiples ensayos químicos, bioquímicos y biológicos en una muestra. El método consiste en el uso de una Placa Multidominios Multipocillos o Placa MDMW que comprende una pluralidad de pocillos, comprendiendo cada uno una pluralidad de dominios de ensayo.

55 Winklhofer *et al.* (FEBS Letters 53(1):41-45, 2001) presenta un ensayo de retención mediante filtro utilizando un dispositivo convencional de mancha de ranura para detectar un analito único PrP^{Sc}. No se menciona el uso de una placa de microtitulación.

60 Barnett *et al.* (J. Virol. 20(4):323-332, 1988) presenta un inmunoensayo de filtración de enzimas mediante membrana (MFEIA) para detectar anticuerpos de virus. El método comprende el uso de placas de microtitulación GV (Millipore Corp. EE. UU.) que representan placas de microtitulación de 96 pocillos que tienen un filtro de membrana en el fondo. No se mencionan adaptaciones a la placa para facilitar la detección simultánea de múltiples analitos.

65 La Patente de los EE. UU. 5 279 937 describe un ensayo de hibridación de oligonucleótidos utilizando una placa de filtración de 96 pocillos. No se mencionan adaptaciones a la placa para facilitar la detección simultánea de múltiples analitos.

65 Guerin-Marchand *et al.* (J. Immunol. Methods 167(1-2):219-225, 1994) presenta un ensayo ELISA utilizando una placa de filtración de 96 pocillos Multiscreen DV (Millipore Corp.). No se mencionan adaptaciones a la placa para facilitar la detección simultánea de múltiples analitos.

ES 2 313 070 T3

Stya *et al.* (J. Immunol. Methods 73(1):75-81, 1984) presenta un ensayo ELISA utilizando placas de filtración de 96 pocillos de nitrocelulosa o fluorocarbono (Millipore Corp.). No se mencionan adaptaciones a la placas para facilitar la detección de múltiples analitos.

5 Aranha-Creado *et al.* (J. Int. Ass. Biol. Stand. 26(2):167-172, 1998) expone que partículas de virus pueden retirarse de una solución utilizando membranas PVDF. No se menciona una placa de microtitulación.

10 Los presentes inventores han encontrado ahora un método para detectar un analito en una muestra líquida que supera una o más desventajas con respecto a los métodos de la técnica anterior. El método incluye a) la provisión de una placa de microtitulación específica tal como se define en la reivindicación 1. El método de la presente invención comprende además los pasos de b) aplicar dicha muestra líquida al menos a un cluster de pocillos, filtrando dicha muestra a través de dicho filtro de membrana, enlazando por tanto dicho uno o más analitos a dicho filtro de membrana o ligandos de captura, y realizando opcionalmente pasos de lavado; y c) detectar dicho uno o más analitos enlazados en dichos pocillos llevando a cabo un ensayo de enlace en dicho filtro de membrana, siendo dicho ensayo de enlace preferentemente un inmunoensayo quimioluminiscente.

15 La presente invención se refiere aún más a la placa de microtitulación específica en sí tal como se provee en el método anterior y al uso de ésta en la detección de analitos.

20 De hecho, cuando se utiliza el método anterior, los inventores presentes han encontrado que este procedimiento reduce grandemente la cantidad de fluidos de lavado requeridos. Es más, se encontró que pueden llevarse a cabo diferentes exámenes analíticos en una sola placa de microtitulación.

25 Como resultado de ello, los presentes inventores han encontrado que una muestra puede aplicarse a un número de contenedores adyacentes en una sola placa de microtitulación mediante un solo paso de aplicación para llevar a cabo diferentes exámenes analíticos en ésta.

30 En un primer aspecto, la presente invención brinda un método para detectar un analito en una muestra tal como se ha descrito aquí anteriormente. En las realizaciones del método de la presente invención, se brinda una pluralidad de pocillos de muestra en la forma de una placa de microtitulación. La totalidad del fondo de dicha placa de microtitulación está provista de un filtro de membrana semipermeable, de manera que el fondo de cada pocillo esté compuesto por un filtro de membrana semipermeable.

35 Tal como se utilizan aquí, los términos “filtro de membrana semipermeable”, “membrana semipermeable” y “filtro de membrana” son todos intercambiables.

40 La pluralidad de pocillos puede ser de cualquier número y configuración y puede disponerse bajo cualquier patrón ornamental, preferentemente, la pluralidad de pocillos se brinda en el formato de una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos, pero también pueden ser particularmente apropiados formatos que comprenden alrededor de 384, 864, 1536, 2400 o alrededor de 3456 pocillos.

45 El número de pocillos adyacentes en un cluster de contenedores puede ser cualquier número apropiado con el objetivo de determinar múltiples analitos en una pluralidad de pocillos. En una realización particularmente preferente del método anterior, el método consiste en el uso de una placa de microtitulación que comprende al menos n^2 pocillos adyacentes, donde n es un entero, preferentemente un entero de 2-10, más preferente de 2-5. Tales números son ventajosos para la codificación de posiciones, estandarización de procedimientos y por razones de manufactura.

50 La presente invención se refiere también a una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de pocillos, en la que el fondo de cada pocillo comprende una membrana semipermeable capaz de enlazar directa o indirectamente un analito, y en la que cada pocillo está separado de un pocillo adyacente mediante una pared divisoria de pocillos, en la que los pocillos están agrupados en uno o más clusters, comprendiendo cada cluster al menos dos pocillos, en la que dichos clusters están separados de los clusters adyacentes mediante una pared divisoria de clusters y en la que al menos parte de la pared divisoria de pocillos es más baja que la pared divisoria de clusters o en la que la pared divisoria de pocillos contiene al menos un pasaje que conecta al menos dos pocillos adyacentes dentro de un cluster, estando dicho pasaje a una distancia del fondo del pocillo y al menos parcialmente por debajo de la parte superior del pocillo.

55 En este método, el funcionamiento de dicha placa de microtitulación es tal que cuando un fluido de muestra se aplica a un primer pocillo en un cluster, y la cantidad de dicho fluido aplicado es tal que el nivel del fluido se eleva sobre la pared divisoria de pocillos o sobre la posición del pasaje, al menos una porción de dicho fluido de muestra aplicado fluiría o se derramaría de dicho primer pocillo hacia un segundo pocillo adyacente hasta que el nivel del fluido de nuevo se equilibre con la pared divisoria de pocillos o quede por debajo de la posición del pasaje. Ahora cuando se aplica una cantidad de fluido que es, debido a su volumen, capaz de dividirse equitativamente en todos los pocillos dentro de un cluster, entonces todos dichos pocillos dentro de ese cluster pueden proporcionarse con un volumen igual del fluido de muestra en un solo paso de aplicación de la muestra.

65 Preferentemente, las paredes de división de los pocillos tienen una altura mínima particular o la posición del pasaje entre pocillos conectados y adyacentes se eleva sobre el fondo del pocillo de manera que una cantidad del

ES 2 313 070 T3

fluido de muestra pueda ser contenido en éste. Esencialmente dicha cantidad es suficiente para llevar a cabo el ensayo de detección sobre el analito. Una dimensión típica de un pocillo es aquella que sea capaz de contener, o tenga la capacidad antes del derrame, de entre 1 y 5 000 μl , preferentemente de 5 a 1 000 μl , más preferente entre 5 y 250 μl de fluido. Por tanto, la placa de microtitulación de la presente invención se caracteriza por la presencia de paredes divisorias de clusters y paredes divisorias de pocillos, en la que las paredes divisorias de clusters permiten el derrame del fluido de muestra de un pocillo al otro. Esencialmente en un método de la presente invención, el derrame ocurrirá cuando la cantidad de fluido cargado dentro de un pocillo exceda la capacidad antes del derrame, también denominado aquí el volumen de derrame. La altura de una pared divisoria de un contenedor es típicamente de 0,1 a 20 milímetros, preferentemente de 1 a 5 milímetros. La altura de una pared divisoria de clusters es típicamente de 0,1 a 1,5 milímetros más alta que la pared divisoria de pocillos, preferentemente de 1 a 5 milímetros más elevada.

Las paredes de división de los pocillos y de los clusters pueden ser de cualquier material y pueden por ejemplo ser todas claras, blancas, negras o transparentes o bloqueadoras de la luz y pueden en principio ser de cualquier color. Preferentemente, las paredes deben bloquear la luz.

Puede llevarse a cabo en principio un método según la presente invención para detectar analitos en cualquier muestra líquida y en cualquier fluido, tal como material flotante de cultivo de células, agua (incluyendo potable, de torre de enfriamiento, de desecho y de procesamiento), extractos de suelos u otros fluidos tales como petróleo, pero preferentemente fluidos corporales tales como, por ejemplo, leche, calostros, orina, sangre (entera), suero, plasma, fluido pleural, fluido gástrico, fluido duodenal, fluido intraocular, fluido ascítico, fluido peritoneal, fluido amniótico, fluido sinovial, fluido cístico, fluido cerebroespinal, fluidos vaginales (incluyendo fluidos menstruales), semen, esputo, saliva, extractos de heces o estiércol, sudor o exudados provenientes de lesiones.

Para la detección de analitos en muestras no fluidas, tales como muestras de tejido de biopsias, puede prepararse apropiadamente una muestra en la forma de una mezcla pastosa, una suspensión, una solución, un macerado, un homogenizado y similares. La muestra puede por tanto comprender una muestra de fluido, un fluido de una muestra, una muestra fluidizada o una preparación a partir de una muestra que es fluida. El analito puede estar presente en la muestra en forma suspendida o disuelta.

La muestra puede derivarse de cualquier fuente o cualquier sujeto incluyendo, pero no limitada a mamíferos, incluyendo, e. g., un humano, un primate no humano, ratón, cerdo, vaca, cabra, gato, conejo, rata, conejillo de Indias, ratón blanco, caballo, mono, oveja, u otro mamífero no humano; y animales no mamíferos, incluyendo, e. g., un vertebrado no mamífero, tal como un ave (e. g., un pollo o pato) o un pez, y un invertebrado no mamífero.

El método es útil para detectar una gran variedad de analitos en una muestra. Los analitos tales como nucleótidos, péptidos o sacáridos, o polímeros de éstos, tales como ADN o ARN, proteínas y polisacáridos, pueden también detectarse utilizando un método de la presente invención. También pueden detectarse anticuerpos, antígenos, enzimas, cofactores, metabolitos, hormonas, priones, virus, bacteria y/u hongos. En general cualquier sustancia química o biológica para la cual pueda proporcionarse una pareja de enlace específico, tal como, por ejemplo, cada uno de los miembros de la pareja de enlace en un par de una pareja de enlace anticuerpo-antígeno, o pares de enlace tales como enzima-sustrato, complejos carga-transferencia, complejos apilados, complejos covalentes, etc., puede determinarse utilizando el método presente.

El término “más” en “uno o más analitos” tal como se utiliza aquí, se entiende que indica diferentes tipos de analitos.

Tal como aquí se utilizan, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos sintéticos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs vinculados a bisulfuro (sdFv) y anticuerpos antidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, e. g., anticuerpos anti-Id a anticuerpos de la presente invención) y fragmentos de enlace a epítopes de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos de la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, i. e., moléculas que contienen un sitio de enlace de antígeno que enlaza inmunoespecíficamente a un analito a ser detectado. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de moléculas de inmunoglobulina.

Los métodos y placas de microtitulación de la presente invención son particularmente útiles para detectar múltiples analitos en una muestra biológica tal como por ejemplo diversos agentes de enfermedades infecciosas o un anticuerpo contra éstas en el hombre o en animales o en parámetros generales en paneles de examen o en menús de exámenes destinados al salón de operaciones, exámenes de emergencia, exámenes de fertilidad, alimentación-conversión, marcadores de tumores, enfermedades autoinmunes, enfermedades de huesos y minerales, enfermedades metabólicas, trastornos y parámetros gastrointestinales, hemostasis, drogas susceptibles de abuso, diabetes, quetosis, leucosis, el campo de la donación de sangre así como paneles de examen respecto a hormonas, alérgenos, GMOs y contaminantes y/o residuos en alimentos, alimentación o el entorno.

Los analitos preferentes a ser detectados por tal ensayo de múltiples analitos son virus y bacterias o anticuerpos contra éstos. En una realización particularmente preferente, los agentes (o anticuerpos contra éstos) que causan tales enfermedades como la encefalopatía bovina esponjiforme (BSE), fiebre aftosa, enfermedad inducida por el virus

ES 2 313 070 T3

respiratorio bovino sincitial (BRSV), diarrea viral bovina, brucelosis, leptospirosis, infección por lombriz pulmonar, fiebre porcina clásica, enfermedad inducida por parvo virus porcino (PPV), enfermedad inducida por virus de pseudorrabia (PrV) (o enfermedad de Aujeszky), enfermedad vesicular porcina, ántrax, Salmonelosis, enfermedad inducida por *Campilobacter*, enfermedad inducida por *E. coli*, cólera, y otras enfermedades bacterianas inducidas, HIV, HBV, HCV, HTLVI y/o HTLVII, se detectan utilizando un método de la presente invención.

También pueden prepararse menús de exámenes de hormonas, enfermedades metabólicas, alimentación-conversión, fertilidad, enfermedad ósea y mineral, quetosis, leucosis, etc., donde dichos menús comprenden un número de exámenes para diferentes agentes. Los menús particularmente apropiados son aquellos dirigidos a exámenes realizados en un campo específico, tal como en la industria de alimentos/alimentación, cuyo menú puede entonces comprender exámenes microbiológicos sobre seguridad alimenticia, exámenes para detectar la presencia de organismos genéticamente modificados (GMOs), o la presencia de contaminantes, toxinas, residuos y hormonas en alimentos y/o productos de la alimentación.

Otros menús apropiados son aquellos dirigidos a exámenes realizados en el campo de la detección ambiental tal como paneles para la detección de atracinas, piretroidenas, toxinas agrícolas o pesticidas tales como herbicidas, fungicidas, molusquicidas, insecticidas, etc. El experto en la técnica identificará fácilmente otros menús apropiados para otros campos a examinar. Por ejemplo, los paneles de ensayo pueden desarrollarse para medir en un ensayo de múltiples análisis una pluralidad de análisis o actividades asociadas a un sistema biológico particular (e. g. paneles de inmunoensayos o ensayos de hibridación para monitorear el ARNm de citoquinas o niveles de proteínas), estado de la enfermedad (e. g. paneles de ensayo para marcadores cardíacos, para identificar alérgenos responsables de las reacciones alérgicas, para identificar organismos infecciosos, etc.), tipo de tejido, organismo, clase de proteínas, enzima o molécula biológica, etc. En una realización, se utiliza un panel de ensayos para proporcionar una huella para identificar un sistema biológico (e. g. un patrón de niveles de análisis asociados a un tipo de célula particular, tipo de organela, tipo de organismo, tipo de tejido, bacteria o virus). Puede utilizarse, por ejemplo, una pluralidad de ensayos para diferentes componentes encontrados dentro de un género de sistemas biológicos para identificar especies o subespecies dentro de ese género. En otra realización, se utiliza una medición diferencial que involucra una pluralidad de ensayos para diferentes componentes dentro de un sistema biológico para identificar el estado del sistema biológico (e. g. estado normal vs. estado enfermo, estado normal vs. activado, etc.) o para identificar los componentes dentro de un sistema biológico que son afectados por una condición externa o estímulo (e. g., cambios en la distribución de componentes asociados al desarrollo de un estado de la enfermedad, adición de una especie estimulante, adición de un candidato potencial a un medicamento, cambios en las condiciones ambientales tales como el pH, la temperatura, etc.). Los paneles de ensayo pueden también utilizarse para determinar la función de una o más proteínas. Por ejemplo, una proteína puede ser seleccionada previamente contra una biblioteca pautada de sustratos de enzimas y/o de parejas potenciales de enlace para identificar actividades enzimáticas o de enlace. A la inversa, una biblioteca pautada de proteínas puede ser expuesta a un material biológico conocido para determinar si alguna de las proteínas enlaza a, reacciona con, o de alguna otra forma es transformada por el material biológico.

Un análisis preferente que es detectado por un método de la presente invención es el agente causante de la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) tal como scrapie (Sc), BSE, enfermedad crónica de consunción (CWD) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), y en particular aquellas causadas por isoformas patogénicas proteicas anteriores PrP^{Sc} (Scrapic), PrP^{BSE} (encefalopatía espongiforme bovina), PrP^{CWD} (enfermedad crónica de consunción), y PrP^{CJD} (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob).

Tal como aquí se utiliza un pocillo se define como un contenedor cilíndrico (circular) que comprende un extremo superior abierto, paredes y un extremo inferior cerrado. Un contenedor típico es un pocillo de una placa de microtitulación regular. Según la presente invención el fondo del pocillo está provisto de un filtro de membrana semipermeable. Aquí, el filtro de membrana semipermeable representa el fondo de pocillos y el fluido aplicado al pocillo puede ser retirado de ese pocillo aplicando una presión reducida de gas o vacío bajo dicho filtro de membrana, extrayendo por tanto el contenido líquido de pocillos a través de dicho filtro. Alternativamente, el fluido aplicado al pocillo puede ser retirado apropiadamente de ese pocillo aplicando una presión positiva de gas, empujando por tanto el contenido líquido de pocillos a través de dicho filtro. La configuración real del pocillo no es esencial siempre y cuando puedan utilizarse medios apropiados, tales como por ejemplo un aspirador de vacío, para retirar su contenido a través del filtro de membrana comprendido en el fondo de dicho pocillo. En una realización preferente de una placa de microtitulación de la presente invención la placa se adapta específicamente para ser utilizada en combinación con un aspirador de vacío.

El pocillo puede ser de cualquier material rígido apropiado tal como vidrio, poliestireno, poliacrilo, poliamida, polietileno, polipropileno, estireno-acrilato-butadieno (ABS), Barnox, cloruro de polivinilo (PVC), nailon, etileno-vinil-acetato (EVA), tereftalato de polietileno (PET), etc. y combinaciones de éstos. El material puede por ejemplo ser todo claro, blanco, negro o transparente u opaco y puede en principio ser de cualquier color.

El filtro de membrana semipermeable puede ser de cualquier material apropiado tal como nitrato de celulosa, acetato de celulosa, éster de celulosa mezclado, polisulfona, sulfona de poliéter, polipropileno, fluoruro de polivinilideno (PVDF), policarbonato, nailon, vidrio (e. g. como microfibras), o politetrafluoretileno (PTFE o Teflón[®]). En principio el filtro puede ser hidrófilo o hidrófobo, cargado positiva o negativamente, en dependencia de la aplicación específica y del análisis examinado o ligando utilizado. El fluoruro de polivinilideno (PVDF) es un filtro de membrana particularmente preferido en el caso de detección de priones.

ES 2 313 070 T3

5 El filtro de membrana semipermeable debe ser capaz de enlazar analitos y/o capturar ligandos para analitos a la vez que permita el paso de reactantes no reaccionados, tales como ligandos de captura no enlazados y/o analitos no enlazados en fluidos de lavado. En principio, por tanto, todos los reactantes excepto el analito a ser detectado y el ligando de captura utilizado en un método de la presente invención, deben ser capaces de pasar sin obstáculos a través de la membrana semipermeable de manera que puedan ser arrastrados por el lavado.

10 Con ventaja, la membrana semipermeable tiene un tamaño nominal de poros en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 μm , preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 2 μm , aún más preferente aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,45 μm .

15 Según la presente invención el filtro de membrana es capaz de enlazar el analito de interés. Este enlace puede ser un enlace directo tal como por ejemplo, un enlace en el que el analito se enlace al filtro de membrana mediante interacción electrostática, o por interacción hidrófoba, enlace covalente, interacciones de carga-transferencia, etc. Tal enlace directo puede ser un enlace permanente o irreversible tal como un enlace covalente o un enlace reversible.

20 De manera alternativa, el enlace del analito de interés al filtro de membrana puede ser indirecto, i. e., facilitado al proporcionar una pareja de enlace específica o no específica para el analito en la forma de un ligando de captura o dentro de dicho filtro de membrana, preferentemente en la forma de un recubrimiento de membrana. El ligando de captura es entonces inmovilizado en o dentro de dicho filtro de membrana, y cualquier técnica apropiada conocida por un experto en la técnica puede ser empleada para tal inmovilización. Los ligandos de captura apropiados pueden ser cualquier pareja de enlace capaz de enlazar al analito, tal como por ejemplo, estreptoavidina o anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, que pueden ser creados contra analitos específicos y que pueden entonces usarse para enlazar el analito indirectamente al filtro de membrana. Otros ligandos de captura apropiados constituyen, por ejemplo, ácidos nucleicos complementarios, incluyendo sondas de ADN, APN o ARN o similares. El experto en la técnica está consciente de las diversas parejas de enlace que pueden ser utilizadas como ligandos de captura en un método de la presente invención.

25 El enlace a la membrana semipermeable es preferentemente específico. El enlace indirecto tal como se describió anteriormente tiene la ventaja de que el enlace resultante es en la mayoría de los casos específico, en particular cuando se utilizan parejas de enlace específicas para el analito como ligandos de captura.

30 En lugar de los procedimientos laboriosos y prolongados de recubrimiento de la técnica anterior, el método presente consiste en la aplicación del ligando de captura en un medio líquido apropiado, aplicando el medio líquido que comprende el ligando de captura al pocillo, incubando opcionalmente durante un corto período de tiempo, usualmente varios minutos, y filtrando todo el contenido del pocillo a través del filtro de membrana, preferentemente mediante presión al vacío efectuando por tanto el enlace del ligando de captura a la membrana semipermeable. Opcionalmente, puede seguirse a continuación con una pequeña cantidad de una solución de lavado para limpiar el filtro de membrana de ligandos de captura no enlazados. Tal procedimiento es mucho más rápido que los procedimientos de recubrimiento convencionales.

35 Existe también la posibilidad de enlazar primero un ligando de captura al analito, por ejemplo al proporcionar tal ligando de captura a la muestra, creando por tanto un complejo ligando de captura-analito, y enlazando dicho complejo al filtro de membrana, estableciendo también por tanto un enlace indirecto del analito al filtro de membrana.

40 Un método para detectar un analito en una muestra según la presente invención comprende un segundo paso de aplicación de dicha muestra líquida a dicho uno o más pocillos de muestras, filtrando dicha muestra a través de dicho filtro de membrana, preferentemente mediante presión al vacío, enlazando por tanto dicho uno o más analitos a dicho filtro de membrana, y llevando a cabo opcionalmente los pasos de lavado.

45 Como se expuso anteriormente, el enlace de dicho uno o más analitos al filtro de membrana puede ser directo o indirecto. En ambos casos, puede requerirse un medio específico o búfer para optimizar el enlace del analito al filtro de membrana directamente, para facilitar la interacción entre el analito y el filtro de membrana-ligando de captura inmovilizado o para optimizar el enlace del complejo analito-ligando de captura al filtro de membrana.

50 Al llevar a cabo el método de detección de la presente invención puede ser apropiado por ejemplo incluir ciertos "bloqueadores" en el medio de incubación para asegurar que las proteínas no específicas o proteasas presentes en la muestra experimental no se entrecruzan o destruyan los ligandos de captura, tales como por ejemplo anticuerpos, que arrojan resultados falsos positivos o falsos negativos. La selección de "bloqueadores" por tanto puede añadir sustancialmente a la especificidad de los métodos de ensayo descritos en la presente invención. El experto en la técnica estará consciente de los diversos componentes que pueden utilizarse en tal medio o búferes para posibilitar y optimizar el enlace de dicho analito al filtro de membrana directamente, o al ligando de captura, tal como un anticuerpo.

55 Un tercer paso en un método para detectar uno o más analitos en una muestra según la presente invención comprende la detección de dicho uno o más analitos enlazados en dichos pocillos de muestras llevando a cabo un ensayo de enlace en dicho filtro de membrana. El experto en la técnica está bien consciente de las diversas posibilidades de detección del analito inmovilizado en el filtro de membrana utilizando ensayos de enlace. Los inmunoensayos son ensayos muy apropiados en este caso, tales como los ensayos ELISA.

ES 2 313 070 T3

Típicamente, los ensayos de enlace comprenden una fase de enlace, en la que una pareja de enlace específica se enlaza al analito, y una fase subsiguiente de detección, en la que se mide una señal. La fase de enlace puede llevarse a cabo antes de aplicar dicha muestra líquida a dicho uno o más pocillos de muestras, i. e. mediante la adición de una pareja de enlace a un fluido de muestras, y permitiendo que ésta se enlace al analito antes de llevar a cabo el segundo paso del método de la presente invención. La fase de enlace se lleva a cabo preferentemente en el tercer paso. La fase de detección por otra parte siempre se lleva a cabo en el filtro de membrana en el tercer paso de un método de la presente invención.

En principio, cualquier tipo de método de detección es apropiado para uso en un método de la presente invención. Por ejemplo, los métodos cromogénico, fosforescente, luminiscente y fluorescente son todos apropiados para uso en un método de detección de uno o más analitos en una muestra según la presente invención. Las técnicas de luminiscencia pueden comprender bioluminiscencia, electro-quimioluminiscencia y quimioluminiscencia. De la última son apropiadas, ambas el tipo de fulgor, utilizando por ejemplo peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (AP) para la conversión enzimática de los sustratos, y el tipo flash, mediante activación del luminol, dioxetano o de la etiqueta de éster-acridinio. El tipo de método de detección utilizado dependerá de las condiciones del ensayo y la persona experta en la técnica será capaz de elegir un método apropiado. La quimioluminiscencia se prefiere respecto a la electro-quimioluminiscencia ya que ésta permite exámenes más simples debido a que no se requiere de electrodo para aplicar una carga eléctrica al sitio de análisis (i. e. al pocillo o a la superficie de la membrana semipermeable a ser medida) y no requiere de equipo específico de detección. Es más mientras el equipo que se pone en contacto con el material infeccioso debe ser lavado intensamente, el equipo que se pone en contacto con material relacionado con priones nunca puede utilizarse de nuevo y debe ser destruido. Por tanto, una placa de microtitulación según la presente invención es preferentemente económica y consumible.

Un típico inmunoensayo quimioluminiscente para la detección de la aplicación del analito inmovilizado enlazado directamente o vía un ligando de captura específico en el filtro de membrana incluye i) la aplicación de un conjugado enzima-anticuerpo, capaz de enlazar específicamente al analito en un búfer apropiado de conjugación; ii) una incubación breve para permitir que ocurra el enlace específico, usualmente del orden de 30 minutos a 2 horas, en dependencia de las condiciones de incubación; iii) la retirada del conjugado no enlazado filtrando la totalidad del contenido del pocillo a través del filtro de membrana, preferentemente mediante presión negativa (vacío); iv) el lavado opcional del filtro de membrana mediante una solución de lavado; v) aplicación del sustrato quimioluminiscente y vi) evaluación luminométrica de la quimioluminiscencia producida en el pocillo. Para aplicaciones de quimioluminiscencia, el pocillo es preferentemente de un material de color blanco, mientras que para aplicaciones fluorescentes se prefiere material de color negro.

El método de la presente invención puede por tanto comprender el uso de una primera pareja de enlace como un ligando de captura en un paso de enlace del analito al filtro de membrana y el uso de una segunda pareja de enlace como parte del ensayo de detección. Tal realización es conocida en la técnica como un ensayo tipo sándwich.

En una realización preferente del método de la presente invención, los pocillos de muestras están provistos en la forma de una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de pocillos de muestras, siendo utilizada entonces dicha placa de microtitulación para llevar a cabo un método de la presente invención. La totalidad del fondo de dicha placa de microtitulación está entonces provista de un filtro de membrana semipermeable que está conectado de manera sellada a las paredes de cada pocillo, de manera que el fondo de cada pocillo esté compuesto por un filtro de membrana semipermeable.

El término "fondo" como aquí se utiliza se entiende que indica la parte inferior del pocillo o una posición esencialmente cercana a la base del pocillo, tal que provea al pocillo con un cierto volumen sobre el filtro de membrana, pero por debajo del pasaje o pared divisoria de pocillos, de estar presente, e incluye el borde inferior o base de la pared del pocillo.

En otra realización preferente, el método incluye el uso de una placa de microtitulación particularmente útil para detectar de forma distintiva múltiples analitos en una sola muestra. Para esta realización, los pocillos individuales en dicha placa de microtitulación están ordenados de manera tal que, dos o más pocillos forman un cluster de pocillos, basándose en la altura de las paredes que los separan, midiendo desde el fondo del pocillo, o basándose en la presencia de un pasaje que conecta a los pocillos individuales dentro de un cluster (ver Figuras 1 y 2).

Las características de las paredes que separan los pocillos individuales en un cluster de pocillos pueden ser tales que las paredes que separan dos o más pocillos adyacentes (paredes divisorias de pocillos) sean más bajas que las paredes que separan dos o más clusters de pocillos (paredes divisorias de clusters). El funcionamiento de la placa de microtitulación según tal realización de la presente invención consiste en que cuando un fluido de la muestra se aplica a un pocillo arbitrario en un primer cluster de pocillos y la cantidad de fluido de la muestra es tal que el nivel del fluido se eleva sobre la pared divisoria de pocillos, al menos una porción de dicho fluido de la muestra se derramará dentro del pocillo adyacente. Por tanto, en principio, la altura de la pared divisoria de pocillos dentro de un cluster es tal que el fluido de la muestra puede fluir libremente entre pocillos adyacentes dentro de dicho primer cluster cuando se aplica un volumen de fluido mayor que un cierto volumen crítico. Sin embargo, el fluido no fluirá libremente entre dos clusters, siempre y cuando la cantidad de dicho fluido sea tal que el nivel de fluido no se eleve sobre la pared divisoria de clusters.

ES 2 313 070 T3

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de pocillos, en la que el fondo de cada pocillo comprende una membrana semipermeable capaz de enlazar directa o indirectamente un analito, y en la que cada pocillo está separado de un pocillo adyacente mediante una pared divisoria de pocillos, en la que los pocillos están agrupados en uno o más clusters, comprendiendo cada cluster al menos dos pocillos, en la que dichos clusters están separados de los clusters adyacentes mediante una pared divisoria de clusters y en la que al menos parte de la pared divisoria de los pocillos es más baja que la pared divisoria de los clusters o en la que la pared divisoria del contenedor contiene al menos un pasaje que conecta al menos dos pocillos adyacentes dentro de un cluster, estando dicho pasaje a una distancia del fondo del pocillo y al menos parcialmente por debajo de la parte superior del pocillo.

Dentro de cada cluster de pocillos, se detectan preferentemente de manera simultánea, varios analitos de una muestra, siendo detectado cada analito preferentemente en un pocillo independiente. Como tal, el filtro de membrana de varios pocillos individuales puede estar recubierto con diferentes ligandos de captura, cuyo detalle se describirá aquí más adelante.

En una realización alternativa de un placa de microtitulación según la presente invención, las paredes del pocillo y las paredes de clusters no necesitan diferir en altura pero, en su lugar, se provee un pasaje, por ejemplo en la forma de una muesca o abertura, perforación o entrada, entre pocillos individuales dentro de un cluster, pero no entre pocillos individuales entre clusters. Dicho pasaje está colocado esencialmente en una posición en la pared del pocillo que está a alguna distancia del fondo de dicho pocillo, de manera que el pocillo pueda ser provisto de una cierta cantidad de fluido sin que dicho fluido fluya o se derrame en un pocillo adyacente y conectado. Esta característica tiene la ventaja de que los pocillos individuales pueden estar provistos con reactantes diferentes, que, en el caso que los reactantes estén contenidos en un volumen de fluido que es inferior al volumen de derrame de dicho pocillo, estos se mantendrán en un pocillo sin trasvasar a pocillos adyacentes. En esta forma, las membranas semipermeables en pocillos individuales pueden estar provistas de diferentes ligandos de captura en una manera más simple.

El término “volumen de derrame” tal como aquí se utiliza, se entiende que abarca el volumen crítico, por sobre el cual el fluido aplicado comienza a fluir hacia dentro de un pocillo adyacente dentro de un cluster.

Una placa de microtitulación según la presente invención no solo apoya un método de la invención en la que una acción individual de descarga (entrega) o aplicación de un fluido de muestra a un pocillo resulta en una partición de esa muestra en múltiples pocillos, sino también a los métodos que comprenden descargas individuales de fluidos de lavado y descargas individuales de medios de detección y reactantes. En tal placa de microtitulación, los fluidos se distribuyen equitativamente automática e instantáneamente en múltiples pocillos, siempre y cuando el volumen provisto en dicha descarga sea al menos el volumen de derrame de un pocillo individual multiplicado por el número de pocillos en ese cluster. Esto reduce grandemente el número de descargas necesarias para llevar a cabo el ensayo de detección. Se prefiere por tanto, que el volumen de derrame de todos los pocillos en una placa de microtitulación sea esencialmente igual.

En una realización particularmente preferente de una placa de microtitulación según la presente invención, cada cluster de pocillos comprende al menos 2, preferentemente al menos n^2 pocillos adyacentes, donde n es un entero, preferentemente un entero de 2-10, más preferentemente de 2-5. El número máximo de pocillos en un cluster dependerá del tipo de placa de microtitulación utilizada (i. e. el número total de pocillos provistos en la misma) y del número de clusters en dicha placa de microtitulación. En principio una placa de microtitulación puede tener uno, pero tiene preferentemente más clusters, siendo cada cluster preferentemente idéntico al otro.

Cada pocillo dentro de un cluster no está necesariamente conectado mediante derrame a todos y cada uno de los pocillos dentro de ese cluster. Por ejemplo, como puede verse en las Figuras 1 y 2, los clusters indicados como F, G, H, K, M y N, también estarán total e igualmente llenos de fluido cuando el volumen de ellos sea al menos el volumen de derrame de un pocillo individual multiplicado por el número de pocillos en ese cluster. El cluster puede adoptar cualquier configuración o forma tal como lo definen los contenedores interconectados que comprenden el mismo, pero las formas cuadradas, rectangulares o lineales son preferentes debido a que ellas permiten una identificación más fácil atendiendo al marcado en la placa.

Una placa de microtitulación según la presente invención es apropiada preferentemente para la detección de un analito por pocillo y múltiples analitos por cluster.

La estructura de una placa de microtitulación según la presente invención puede ser tal que uno o más clusters, o preferentemente uno o más contenedores dentro de un cluster estén destinados a estándares internos, controles y calibradores. Por ejemplo, uno o más pocillos pueden dejarse sin ligando de captura o pueden ser recubiertos con un agente bloqueador para inhibir el enlace del analito a la membrana o con un material biológico que no está previsto que participe en una reacción con una muestra; tales pocillos pueden ser utilizados para medir y/o corregir el enlace no específico de marcas a la superficie del pocillo. En otro ejemplo, uno o más pocillos se recubren con un reactante marcado (e. g. un reactante marcado con un marcador de detección); tales pocillos pueden utilizarse para medir y/o corregir las condiciones que pueden afectar la generación y medición de la señal de un marcador (e. g. pH, temperatura, interferentes químicos, especies coloreadas, etc.). En otro ejemplo, uno o más pocillos se utilizan para llevar a cabo un ensayo de control de un analito de control que está imbricado dentro de la mezcla de ensayo. Preferentemente, el ensayo de control es similar en formato a ensayos llevados a cabo en otros pocillos de un cluster. Los ensayos de

control pueden utilizarse para medir y/o corregir enlaces no específicos, las condiciones que afectan la generación de señales a partir de un marcador y las condiciones que afectan las reacciones del ensayo (variaciones en el tiempo de incubación, temperatura, mezclado, etc.).

5 Un método para detectar múltiples analitos en una muestra está particularmente bien apoyado ahora mediante tal ordenamiento de los clusters de los pocillos dentro de la placa de microtitulación de la presente invención. Se requiere que en una placa de microtitulación de la presente invención las paredes de al menos cierta altura se mantengan entre pocillos adyacentes, o que un pasaje esté a alguna distancia del fondo. El resultado de esto radica en que dentro de un cluster de pocillos adyacentes, a cada pocillo individual se le puede proporcionar de un fluido que comprende un
10 ligando de captura específico diferente, de manera que los filtros de membrana en diferentes pocillos se les provea de ligandos de captura específicos diferentes, y que como resultado de esto diferentes analitos específicos de una muestra puedan ser capturados o inmovilizados mediante enlace indirecto al filtro de membrana en el fondo de los pocillos individuales. Las detecciones de diferentes analitos a partir de una muestra individual pueden llevarse a cabo simultáneamente en esos pocillos adyacentes. Una placa de microtitulación de la presente invención comprende en una realización al menos un pocillo en un cluster de pocillos que comprende un ligando de captura para enlazar un
15 analito al filtro de membrana de dicho pocillo. En otra realización cada pocillo en un cluster de pocillos comprende un ligando de captura diferente para enlazar indirectamente el analito al filtro de membrana.

En el caso de que varios pocillos en un cluster estén provistos de diferentes cantidades de ligandos de captura (preferentemente conocidos, más preferentemente calibrados), tal que diferentes cantidades de analitos (preferentemente conocidos, más preferentemente calibrados), se enlacen en diferentes pocillos dentro de un cluster, tal cluster puede utilizarse para determinar la cantidad de analito presente en la muestra, o determinar la capacidad de enlace del ligando de captura.

25 Los ligandos de captura específicos inmovilizados en los filtros de membrana de pocillos individuales pueden por ejemplo ser seleccionados a partir de anticuerpos específicos para agentes de enfermedades infecciosas o estructuras seleccionadas o partes de agentes de infección tales como los agentes descritos. El experto en la técnica entenderá que pueden seleccionarse muchos ligandos de captura a analitos diferentes para enlazar analitos a los filtros de membrana de pocillos específicos. Es más, el experto en la técnica entenderá que el procedimiento de detección puede seleccionarse a partir de muchos formatos de ensayo de enlace diferentes y que tal procedimiento puede aún ser llevado a cabo con anticuerpos no específicos en caso de que la captura al propio filtro de membrana sea específica, aunque se prefiere el uso de anticuerpos específicos.

30 Para producir una placa de microtitulación particularmente útil para detectar de manera distintiva múltiples analitos en una muestra según un método de la presente invención, el experto en la técnica entenderá que las paredes de los contenedores adyacentes en una placa de microtitulación estándar pueden reducirse en altura o eliminarse (parcialmente) desbastando (parte de) las paredes que separan dos o más pocillos adyacentes. De manera alternativa, por ejemplo, una placa de microtitulación que comprende 96 pocillos cuadrados sin fondo puede pegarse en la parte superior de una placa de microtitulación de 384 pocillos cuadrados cuya base está provista de un filtro de membrana semipermeable. La alineación de los pocillos de la placa superior en relación a la placa inferior debe ser tal que la esquina de abajo de cada pared de un pocillo de la placa de 96 pocillos sin fondo se alinea con 4 pocillos en la placa inferior. Mediante tal procedimiento, se provee una placa de microtitulación según la presente invención que comprende 96 clusters, comprendiendo cada cluster 4 pocillos. También pueden barrenarse o proporcionarse de otras formas, pasajes a pocillos adyacentes dentro de un cluster tales como los antes descritos de manera tal que todos los pocillos en ese cluster estén
45 conectados de alguna forma, directa o indirectamente.

En un aspecto final, la presente invención se refiere al uso de una placa de microtitulación según la invención para la detección de analitos en una muestra. En un uso preferente, se detectan analitos múltiples, diferentes en dicha placa de manera simultánea. El uso según este aspecto de la presente invención puede ser ventajoso para todos los campos del análisis químico y (bio)médico en los que las muestras deban estar sometidas a ensayos de enlaces múltiples. Preferentemente, el uso se refiere al diagnóstico de múltiples agentes de enfermedades.

55 En una realización particularmente preferente de diversos aspectos de la presente invención se provee un ensayo de múltiples analitos cuyo ensayo comprende el uso de una placa de microtitulación según la presente invención en la que en cada cluster de pocillos, se detectan simultáneamente diversos analitos de una sola muestra, siendo detectado cada analito preferentemente en un pocillo separado. Como se expuso, esto puede lograrse de manera muy apropiada recubriendo el filtro de membrana de varios pocillos individuales con diferentes ligandos de captura.

60 En una realización muy preferente, los diversos ligandos de captura se seleccionan de manera tal que la placa de microtitulación de la presente invención apoye la realización de menús específicos de diagnóstico o paneles tal como se describió anteriormente que, por ejemplo, cuando se lleve a cabo, indique el agente causante específico de una enfermedad. Por ejemplo, menús dirigidos al diagnóstico del agente causante de la mastitis pueden entonces llevarse a cabo utilizando una placa de microtitulación de la presente invención cuyo filtro de membrana de los pocillos individuales esté recubierto con ligandos de captura capaces de enlazar específicamente los agentes causantes de la mastitis, e. g. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uteris*, *Streptococcus galacticae* y/o *Streptococcus agalacticae*, potencialmente presentes en una muestra de la que se sospecha. De manera alternativa, o en combinación con ellos, los anticuerpos contra tales agentes que son producidos por el sujeto del cual se obtiene la muestra pueden ser detectados en dicha muestra.

ES 2 313 070 T3

Otros menús apropiados incluyen menús para agentes específicos de enfermedades o para tipos de enfermedades específicas tales como:

5 Pestivirus (incluyendo ligando de captura para el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), Virus de la Enfermedad de la Frontera (BDV), Virus Clásico de Fiebre Porcina (CSFV), etc. y/o anticuerpos de estos).

Diarrea (incluyendo ligandos de captura para *E. coli*, Rotavirus, Coronavirus (e.g. coronavirus (BCV)), *Cryptosporidium*, *Escherichia coli* K99, enterotoxigénica, *Salmonellae* spp. y/o anticuerpos de éstos).

10 Enfermedades respiratorias (incluyendo ligandos de captura para Virus 1 de herpes bovino (BHV1), BVD, virus sincítico respiratorio bovino (BRSV), virus bovino de parainfluenza 3 (PI3), adenovirus, *Mycoplasma bovine*, *Pasteurella haemolytica* y/o anticuerpos de éstos.

15 - Enfermedad de Johne (sensibilidad incrementada): (incluyendo e. g. ligandos de captura para anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis*, interferón gamma, etc.).

Menú de príon aberrante (incluyendo ligandos para nvBSE, nveScrapie, nvCWD, nvCFJ).

20 Alternativamente, una placa de microtitulación de la presente invención puede diseñarse de manera que apoye la realización de menús específicos de diagnóstico relacionados con un animal en particular, por ejemplo que comprenda ligandos de captura para diversos agentes causantes o para anticuerpos producidos contra cerdos, ovejas, vacas, caballos, etc. Por ejemplo:

25 - Vacas (Ganado): un menú en el cual pueden incluirse ligandos de captura para detectar la presencia de Virus Respiratorio Bovino Sincitial (BRSV); Virus de Diarrea Viral Bovina (BVDV); Brucilla, opcionalmente subdividida en *B. abortus* y *B. melitensis*; Virus de Fiebre Aftosa (FMDV); Leptospirosis (e. g. *Leptospira interrogans serovar hardjo*); *Dictyocaulus viviparus* (lombriz de pulmón); BSE (enfermedad de las vacas locas); *Hemophilussomnus*; *Pasteurella haemolytica*;

30 Cerdos: un menú en el cual pueden incluirse ligandos de captura para detectar la presencia de Virus de Fiebre Bovina Clásica (CSFv), opcionalmente de cepa específica; Virus de Fiebre Aftosa (FMDV); Parvo Virus Porcino (PPV); Virus de Pseudorabia; Virus de Enfermedad Vesicular Porcina (SVDV), virus porcino de síndrome respiratorio y reproductivo (PRRSV o Lelystadvirus), circovirus 1 y 2 porcino (causante de síndrome de consunción multisistémica (PMWS), Virus de Influenza en Cerdos (SIV).

35 Ovejas: Un menú en el cual pueden incluirse ligandos de captura para detectar la presencia de *Brucella*, opcionalmente subdividida en *B. abortus* y *B. melitensis*; Virus de Fiebre Aftosa (FMDV).

40 También diversos menús de propósito específico pueden diseñarse tales como menús específicos de exportación que son dependientes del país, tales como menús que comprenden ligandos de captura para llevar a cabo por ejemplo un examen Aujeszky, un examen de *Salmonella*, un examen SVDV y un cuarto examen, que puede variarse en dependencia del status específico de las diversas enfermedades en ese país.

45 Otro menú de propósito específico puede comprender por ejemplo un menú específico de banco de sangre que comprenda un menú de ligandos de captura para la detección de los diversos agentes de enfermedades infecciosas que son examinados en instalaciones de donaciones de sangre, e. g. parejas de enlace para virus de inmunodeficiencia humana (HIV) 1 y 2; virus de la hepatitis B (HBV); Anticuerpo de núcleo de Hepatitis B (AHBC); virus de Hepatitis C (HCV); virus linfotrópicos-T humanos I y II (HTLV); sífilis, gonorrea; enfermedad de Lyme y Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

50 Otros menús aún pueden por ejemplo incluir tales menús para exámenes de alergias específicas.

Referencias citadas en la descripción

55 Este listado de referencias citadas por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. Éste no forma parte del documento de la patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP no reconoce reclamaciones o responsabilidad en este sentido.

60 Documentos de patentes citados en la descripción

- EE. UU. 20 030 113 713 A
- EE. UU. 5 279 937 A

65 Literatura no asociada a patentes citada en esta descripción

- WINKLHOFER *et al.* *FEBS Letters*, 2001, vol. 53 (1), 41-45

ES 2 313 070 T3

- **BARNETT** *et al. J. Virol.*, 1988, vol. 20 (4), 323-332
- **GUERIN-MARCHAND** *et al. J. Immunol. Methods*, 1994, vol. 167 (1-2), 219-225
- 5 • **STYA** *et al. J. Immunol. Methods*, 1984, vol. 73 (1), 75-81
- **ARANHA-CREADO** *et al. J. Int. Ass. Biol. Stand.*, 1998, vol. 26 (2), 167-172.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de pocillos de un material rígido seleccionado entre el grupo que consta de vidrio, poliestireno, poliacrilo, poliamida, polietileno, polipropileno, estireno-acrilato-buta-
10 dieno (ABS), Barnox, cloruro de polivinilo (PVC), nailon, acetato de etileno-vinilo (EVA), tereftalato de polietileno (PET) y combinaciones de éstos, en la que cada pocillo es un pocillo de una placa de microtitulación regular, y en la que cada pocillo está separado de un pocillo adyacente mediante una pared divisoria de pocillos, **caracterizada**
15 porque el fondo de cada pocillo está compuesto por un filtro de membrana semipermeable capaz de enlazar directa o indirectamente un analito, y en la que dichos pocillos están agrupados en uno o más clusters, comprendiendo cada cluster al menos dos pocillos, en la que dichos clusters están separados de clusters adyacentes mediante una pared divisoria de clusters y en la que al menos parte de la pared divisoria de pocillos es más baja que la pared divisoria de clusters, o en la que la pared divisoria de pocillos contiene al menos un pasaje que conecta al menos dos pocillos adyacentes dentro de un cluster, estando dicho pasaje a una distancia del fondo del pocillo y al menos parcialmente por debajo de la parte superior del pocillo.

2. Placa de microtitulación según la reivindicación 1, en la que cada cluster de contenedores comprende al menos n^2 contenedores, donde n es un entero, preferentemente un entero de 2-10, más preferente de 2-5.

20 3. Placa de microtitulación según la reivindicación 1 o 2, en la que dicho filtro de membrana comprende fluoruro de polivinilideno (PVDF).

4. Placa de microtitulación según una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en la que al menos un pocillo en un cluster de pocillos comprende un ligando de captura para enlazar específicamente un analito al filtro de membrana de dicho pocillo.

5. Placa de microtitulación según una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, en la que al menos dos pocillos en un cluster de pocillos comprende una cantidad diferente de ligandos de captura para enlazar específicamente un analito a dicho filtro de membrana.

30 6. Placa de microtitulación según una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, en la que al menos dos pocillos en un cluster de pocillos comprenden un ligando de captura diferente para enlazar específicamente un analito a dicho filtro de membrana.

35 7. Placa de microtitulación según una cualquiera de las reivindicaciones de la 4 a la 6, en la que dicho analito es un agente de enfermedad infecciosa o un anticuerpo contra éste.

40 8. Placa de microtitulación según una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, en la que al menos un cluster comprende ligandos de captura específicos para la detección del agente causante de la tembladera ovina o caprina (*scrapie*), encefalopatía espongiforme bovina (BSE), enfermedad de consunción crónica y/o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

45 9. Placa de microtitulación según la reivindicación 8, en la que al menos un cluster comprende ligandos de captura para la detección de isoformas patogénicas de proteínas de priones PrP^{Sc} (*scrapie*), PrP^{BSE} (encefalopatía espongiforme bovina), PrP^{CWD} (enfermedad de consunción crónica) y/o PrP^{CJD} (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob).

10. Un método para la detección de uno o más analitos en una muestra líquida que comprende:

50 a) proporcionar una placa de microtitulación según una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9;

b) aplicar dicha muestra líquida al menos a un cluster de pocillos, filtrando dicha muestra líquida a través de dicho filtro de membrana, enlazando por tanto dicho uno o más analitos a dicho filtro de membrana o ligandos de captura, y llevando a cabo opcionalmente los pasos de lavado;

55 c) detectar dicho uno o más analitos enlazados en dichos pocillos llevando a cabo un ensayo de enlace en dicho filtro de membrana, siendo dicho ensayo de enlace preferentemente un inmunoensayo quimioluminiscente.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho uno o más analitos comprenden un agente de enfermedad infecciosa o un anticuerpo contra éste.

60 12. Método según la reivindicación 11, en el que el agente de enfermedad infecciosa es un prión, preferentemente un prión causante de encefalopatía espongiforme (TSE).

65 13. Uso de una placa de microtitulación tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, para la detección de analitos en una muestra líquida.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que dicha detección comprende la detección simultánea de múltiples analitos en dicha muestra.

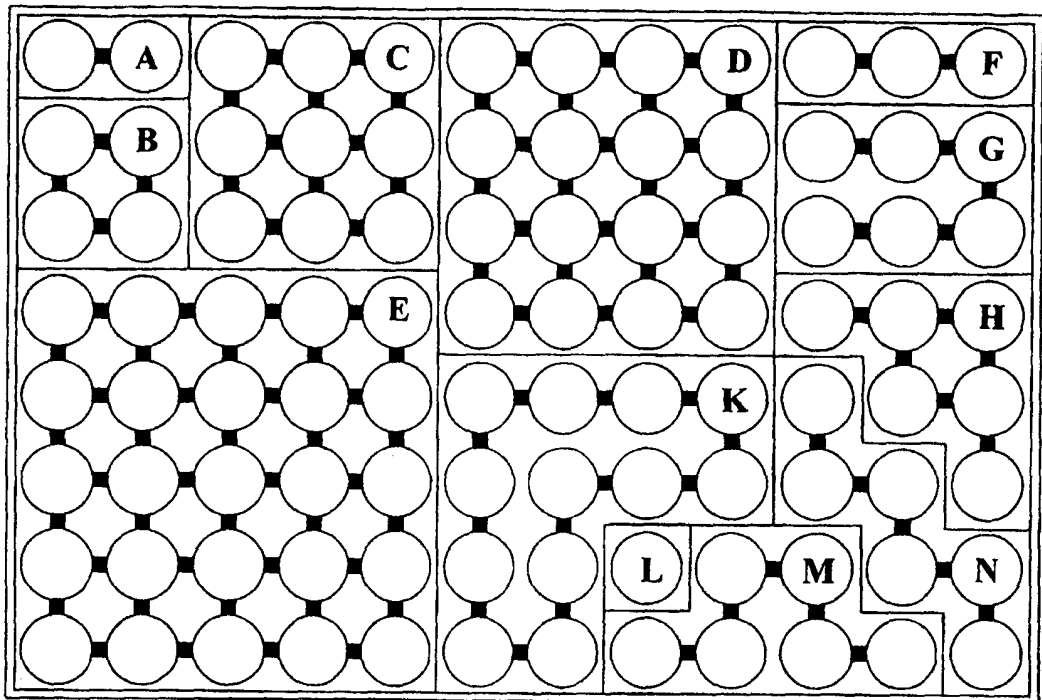


Figura 1

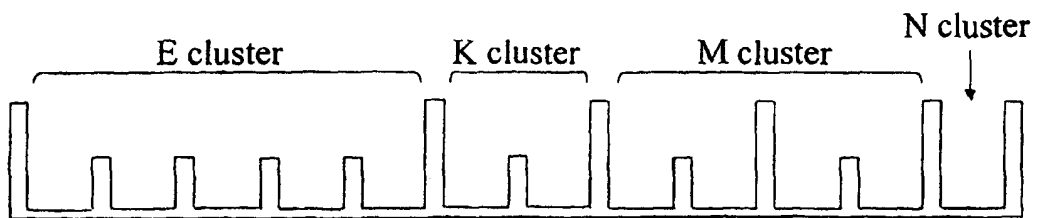


Figura 2