



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 132 044**

⑤① Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/541 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
A61K 39/106 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

⑨⑥ Número de solicitud europea: **97303147 .9**
⑨⑥ Fecha de presentación : **08.05.1997**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **0806667**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.1997**

⑤④ Título: **Inmunoensayo para *H. pylori* en muestras fecales.**

③⑩ Prioridad: **09.05.1996 US 647115**

④⑤ Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.03.2002**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.12.2008**

④⑤ Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.12.2008**

⑦③ Titular/es: **MERIDIAN BIOSCIENCE, Inc.**
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244, US

⑦② Inventor/es: **Larka, Christopher Vance;**
Yi, Ching Sui Arthur y
Kozak, Kenneth James

⑦④ Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 132 044 T5

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo para *H. pylori* en muestras fecales.

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para detectar *Helicobacter pylori* en muestras fecales.

H. pylori es una bacteria que se encuentra en la parte superior del tracto gastrointestinal de los seres humanos, que se ha implicado en enfermedades gastroduodenales tales como úlceras pépticas, gastritis y otras enfermedades. La bacteria se clasificó originalmente dentro del género *Campylobacter* y posteriormente se reclasificó dentro del género *Helicobacter* basándose en una información más detallada de su ultraestructura y su composición de ácidos grasos.

10 Para detectar *H. pylori* se han usado varias técnicas diferentes, tanto invasivas como no invasivas. Las técnicas invasivas incluyen biopsias gástricas y cultivos. Las técnicas no invasivas incluyen el ensayo de urea en el aliento, en el que al paciente se le administra urea marcada con C-13 o C-14 con una poción, y posteriormente se detectan los anticuerpos contra *H. pylori* en suero usando antígenos en ensayos inmunoabsorbentes ligados a una enzima (ELISA). Se pueden encontrar ejemplos de estas últimas técnicas en la Patente de Estados Unidos 5.262.156 de Aleonohammad y en la Patente europea 0 329 570 de Blaser.

20 En los inmunoensayos para detectar anticuerpos contra *H. pylori* se han identificado y usado varios antígenos importantes. Sin embargo, estos ensayos no han mostrado la especificidad y sensibilidad deseadas en los serodiagnósticos. Newell, D.G., y col. *Serodiam. Immunother. Infec. Dis.* 3:1-6 (1989). Un problema asociado con estos inmunoensayos es la reactividad cruzada. Los estudios de los antígenos dominantes de *H. pylori*, en particular, la supuesta proteína flagelar, que tiene un peso molecular de 60 Da, han demostrado que algunos de estos antígenos no son específicos para *H. pylori* y también se han encontrado en otras bacterias tales como *C. jejuni* y *C. coli*. Un segundo problema con el que se ha tropezado en el diseño de inmunoensayos para *H. pylori* es la variación entre las cepas. Se han observado diferencias sustanciales en los antígenos de diferentes cepas de *H. pylori*. Estos problemas imposibilitan el diseño de un ensayo basado en el uso de un solo antígeno. También descartan el uso de anticuerpos monoclonales. Un enfoque que se ha empleado para mejorar la especificidad y la selectividad de inmunoensayos de anticuerpos para *H. pylori* ha sido el uso de una mezcla de antígenos de diferentes cepas de *H. pylori* que está enriquecida con ciertos fragmentos de antígenos. En Meridian Diagnostics está disponible un ELISA que detecta anticuerpos contra *H. pylori* en suero sanguíneo. Este ensayo usa un lisado de células bacterianas enteras como antígeno.

35 Existen ciertos inconvenientes en el uso de un ELISA que emplea antígenos para detectar la presencia de anticuerpos contra *H. pylori*. En particular, la titulación de anticuerpos en el suero humano sigue siendo elevada durante un periodo prolongado de tiempo (en algunos casos de hasta seis meses) después de haberse tratado la infección. Por consiguiente, un resultado positivo de este ELISA no significa necesariamente que el paciente esté infectado realmente y requiera tratamiento para la infección de *H. pylori*. Cuando se enfrentan a un ELISA positivo, los médicos a menudo piden una biopsia gástrica para confirmar la presencia de la bacteria antes de iniciar la terapia con antibióticos. Por lo tanto, el ELISA basado en antígenos no elimina la necesidad del procedimiento invasivo. Por el contrario, si pudiera diseñarse un inmunoensayo para detectar el antígeno de *H. pylori* en lugar del anticuerpo, la necesidad de obtener biopsias gástricas para confirmar la infección se reduciría significativamente, ya que el antígeno generalmente no puede detectarse en un paciente a los pocos días de su tratamiento. De esta manera, existe la necesidad de un ELISA que detecte un antígeno de *H. pylori* y, más particularmente, existe la necesidad de un ELISA para detectar *H. pylori* directamente a partir de muestras fecales.

45 Aunque se conocen ELISA para detectar microorganismos tales como *C difficile* y adenovirus en muestras fecales, en los estudios de pacientes con biopsias gástricas positivas para *H. pylori*, las bacterias normalmente no pueden cultivarse y aislarse a partir de las muestras fecales. Este problema, junto con los problemas de la reactividad cruzada y la variación entre las cepas, suscitó serias dudas de que pudiera diseñarse un ELISA específico para *H. pylori* y suficientemente sensible como para detectar de forma fiable el antígeno de *H. pylori* directamente en una muestra fecal.

55 Kelly y col., *Gastroenterology*, Vol. 107, 1994, 1671-1674, describen un intento de aislar *H. pylori* a partir de muestras de heces fecales. *Biogenesis, Immunoassay Catalogue*, 1994-1995 y *Biodesign, Immunological Reagents* 1993-1994, describen anticuerpos policlonales para el antígeno de *H. pylori*. *Clinical Chemistry*, Vol. 22, No. 8, 1976, 1243-1255, describe el concepto general de los ensayos ELISA.

60 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar *H. pylori* en muestras fecales, que comprende:

(a) dispersar una muestra fecal que se sospecha que lleva *H. pylori* en un diluyente de muestra;

(b) poner en contacto la muestra fecal en el diluyente con un primer anticuerpo policlonal contra el antígeno de *H. pylori* para formar un complejo del anticuerpo y el antígeno;

65 (c) separar dicha muestra de dicho complejo;

ES 2 132 044 T5

(d) exponer el complejo a un segundo anticuerpo policlonal contra dicho antígeno y contra una porción del anticuerpo que reacciona con dicho complejo, estando unido uno de dichos primer y segundo anticuerpos a un soporte y estando unido el otro anticuerpo a un agente de detección, y

5 (e) determinar la cantidad de anticuerpo marcado y, a su vez, determinar la presencia del antígeno de *H. pylori* en dicha muestra fecal.

En una realización preferida, el primer anticuerpo está unido a un soporte y el segundo está marcado con una enzima. También se proporcionan ensayos de triple sándwich.

10

En un segundo aspecto alternativo, la invención proporciona un procedimiento para la determinación de *H. pylori* en una muestra fecal, que comprende:

(a) dispersar una muestra fecal que se sospecha que contiene *H. pylori* en un diluyente de muestra;

15

(b) poner en contacto la muestra fecal en el diluyente con un primer anticuerpo policlonal contra el antígeno de *H. pylori* unido a un soporte sólido y un segundo anticuerpo policlonal marcado contra *H. pylori* para formar un complejo de los anticuerpos y el antígeno;

20

(c) separar dicha muestra y dicho complejo; y

(d) determinar la cantidad del anticuerpo marcado y, a su vez, determinar la presencia del antígeno de *H. pylori* en dicha muestra fecal.

25

De acuerdo con un tercer aspecto alternativo de esta invención, se proporciona un procedimiento para la determinación de *H. pylori* en una muestra fecal, que comprende:

(a) dispersar una muestra fecal que se sospecha que contiene *H. pylori* en un diluyente de muestra;

30

(b) poner en contacto la muestra fecal en el diluyente con un primer anticuerpo policlonal contra el antígeno de *H. pylori* producido por una primera especie productora de anticuerpos y unido a dicho soporte sólido para formar un complejo del anticuerpo y el antígeno;

35

(c) separar dicha muestra y dicho complejo;

(d) poner en contacto el complejo de antígeno-anticuerpo formado en la etapa (b) con un anticuerpo policlonal primario contra el antígeno de *H. pylori* obtenido a partir de una segunda especie productora de anticuerpos, para producir un complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo;

40

(e) retirar el anticuerpo primario no presente en el complejo de la etapa (d);

(f) poner en contacto el complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo formado en la etapa (d) con un anticuerpo secundario, siendo dicho anticuerpo secundario un anticuerpo contra la segunda especie productora de anticuerpos, formando dicho anticuerpo secundario un complejo con dicho complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo; y

45

(g) determinar la presencia del antígeno de *H. pylori* en dicha muestra fecal.

El inmunoensayo de los presentes solicitantes emplea anticuerpos policlonales contra *H. pylori*. Estos anticuerpos pueden obtenerse a partir del suero de un animal sensibilizado. La sensibilización puede conseguirse inyectando el antígeno en una especie productora de anticuerpos, típicamente un mamífero y preferiblemente un conejo, una cabra o una vaca. Normalmente se administra una inyección inicial seguida de inyecciones de refuerzo posteriores para maximizar la respuesta. Óptimamente, el régimen de inyección consta de dosis múltiples administradas a conejos blancos de Nueva Zelanda. La cantidad de antígeno inyectado deberá ser adecuada para inducir una cantidad de anticuerpo suficiente como para ser detectable. La producción de anticuerpos se verifica usando un estudio de extracción de sangre y un Ensayo de Fluorescencia Indirecta.

50

Se ha descubierto que las células de *H. pylori* de la cepa ATCC 43504 son particularmente útiles en la producción del anticuerpo policlonal. Como se ha mencionado anteriormente, se ha observado una variación sustancial entre las cepas de *H. pylori*. Se han observado diferencias entre los organismos de diferentes regiones geográficas así como de diferentes grupo dietéticos. Sin embargo, se ha descubierto que los anticuerpos obtenidos por medio de sensibilización usando células de la cepa 43504 son útiles en la detección del organismo en todas las regiones geográficas y grupos dietéticos. Si es necesario, por ejemplo, si se descubre que el ELISA no es eficaz en la detección del organismo en ciertas poblaciones, pueden usarse células de más de una cepa de *H. pylori* para producir el anticuerpo.

65

Para usar el anticuerpo policlonal de la presente invención pueden usarse los mismos marcadores usados en los ensayos inmunométricos conocidos.

ES 2 132 044 T5

Entre éstos pueden mencionarse marcadores fluorogénicos para detección por fluorimetría tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 3.940.475, marcadores enzimáticos como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 3.654.090, y radioisótopos tales como Yodo-125. Uno de los marcadores enzimáticos más comunes es la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la enzima fosfatasa alcalina. El Ejemplo 3 presentado más adelante ilustra el marcaje de anticuerpos policlonales con HRP.

El anticuerpo policlonal no marcado usado en el procedimiento de la presente invención para extraer la sustancia antigénica de la muestra fecal a ensayar puede inmovilizarse en cualquiera de los soportes usados comúnmente en ensayos inmunométricos. Entre los que pueden usarse se encuentran papel de filtro, perlas de plástico, polietileno, poliestireno, polipropileno u otros tubos de ensayo adecuados. Las técnicas para unir anticuerpos a tales materiales son bien conocidas para los especialistas en la técnica.

Para preparar la muestra fecal para uso en el ensayo, la muestra se dispersa en un diluyente de muestra basado en proteínas. El diluyente se formula y se tampona para minimizar la reactividad cruzada. Como ejemplos de diluyentes de muestra pueden mencionarse el suero bovino fetal, suero normal de cabra, suero de cobaya, suero de caballo, caseína, albúmina, gelatina y albúmina de suero bovino (BSA). También se ha considerado útil una dilución de una parte de muestra fecal y cuatro partes de diluyente. Además de usar los aditivos basados en proteínas, la reactividad cruzada puede reducirse añadiendo detergentes y aumentando o reduciendo el pH o la intensidad iónica del tampón diluyente. Por ejemplo, muchos diluyentes de muestra contienen Triton X-100 (Marca Comercial Registrada) y/o Tween 20 (Marca Comercial Registrada) a concentraciones que varían entre un 0,05% y un 2%. Para alterar la intensidad iónica del sistema tamponante, puede añadirse NaCl en intervalos comprendidos entre el 0 y el 2,9%. Estos cambios aumentan la especificidad reduciendo la probabilidad de formación de interacciones débiles o no específicas.

La reactividad cruzada también puede tratarse en la formulación de las soluciones de anticuerpo y en los lavados que se usan en el ensayo. El anticuerpo puede proporcionarse en una solución tamponada junto con uno de los sueros proteicos mencionados previamente. Los lavados usados en el ensayo pueden formularse y tamponarse por medio de la adición de sales y tensoactivos para controlar la reactividad cruzada. Un lavado preferido para reducir la reactividad cruzada es una solución salina tamponada con fosfato.

En los siguientes ejemplos no limitantes se ilustran con más detalle la preparación del antígeno, la producción de los anticuerpos policlonales y el ELISA.

Ejemplo 1

Preparación del antígeno de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

Se cultivó *H. pylori* (cepa ATCC 43504) en líneas sobre agar con tripticasa de soja (TSA) suplementado con un 5% de sangre de oveja desfibrinada para su aislamiento. La placa se incubó a 37°C en un medio microaerófilo durante 6-7 días. El crecimiento bacteriano resultante se evaluó por medio de la morfología de las colonias, reacciones de ureasa, catalasa y oxidasa, y tinción gram. Las colonias con un crecimiento aceptable se subcultivaron en cuatro placas de agar con sangre de oveja y TSA y se dejaron crecer a 37°C en un medio microaerófilo durante 3-4 días.

A cada placa se le añadieron 5 ml de NaCl al 0,85% y las bacterias desarrolladas se recogieron con un extensor de placas. Las bacterias se centrifugaron a 10.000 xg durante 15 minutos a 2-8°C. Cada sedimento se resuspendió en 3 ml de NaCl al 0,85% y se mezcló en un tubo de centrifuga. La suspensión bacteriana se centrifugó a 10.000 xg durante 15 minutos a 2-8°C. El sedimento se resuspendió y se centrifugó como se ha indicado anteriormente. El sedimento final se resuspendió en un 3% del volumen original total de tampón fosfato 20 mM. Las células bacterianas se transfirieron a un recipiente con hielo y se sonicaron 5 veces durante 3 minutos a la potencia máxima que no producía espuma, dejando un periodo de reposo de 30 segundos entre los ciclos. Las células bacterianas sonicadas se centrifugaron a 57.000 xg durante 15 minutos a 2-8°C. Se recogió el sobrenadante bacteriano y se desechó el sedimento.

Ejemplo 2

Producción de Anticuerpos Policlonales de Conejo

El sobrenadante bacteriano obtenido en el Ejemplo 1 se diluyó en partes iguales con adyuvante completo de Freund (un total de inmunógeno de 1,0 ml) para proporcionar 1 x 10⁹ células por ml. Esta solución se mezcló minuciosamente, y 0,2-0,5 ml de la solución se inyectaron por vía intramuscular en la pata trasera derecha y 0,1-0,25 ml de la solución se inyectaron por vía subcutánea en un total de ocho a diez puntos del lomo. Las inyecciones posteriores se espaciaron por periodos de un mes, usaron adyuvante incompleto de Freund y fueron inyecciones subcutáneas en el lomo.

Después de tres meses se extrajo sangre para el ensayo. La sangre se extrajo de la vena central de la oreja una semana después de la tercera inyección. Esta sangre se incubó durante una noche a 2-8°C. Al día siguiente, la sangre se centrifugó a 5.000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante y el sedimento se desechó. El sobrenadante se ensayó por medio de un Ensayo de Fluorescencia Indirecto (IFA). El IFA se realizó poniendo 10 µl de suspensión de *H. Pylori* en portaobjetos de vidrio y realizando una fijación térmica. Los portaobjetos se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% durante 5 minutos y después se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) mezclada con Tween 20 al 0,5% (lavado de PBS/Tween). Se añadieron 50 µl de la

ES 2 132 044 T5

sangre de ensayo y suero de conejo normal, como control, diluidos 1:10 en solución salina tamponada con fosfato con azida sódica (PBSA) y se incubaron en un medio húmedo durante 30 minutos. Después del lavado con PBS/Tween, se diluyeron anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados con FITC (isotiocianato de fluoresceína) 1:10 en PBSA y se añadieron 50 μ l a cada pocillo. Los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos en un medio húmedo oscuro. Los portaobjetos se lavaron de nuevo. Se añadieron un medio de montaje de ensayo de fluorescencia y un cubreobjetos y las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. Después se extrajo sangre de volumen de los conejos cuyo suero mostró una lectura de intensidad de fluorescencia de 4+.

La sangre de volumen se obtuvo de forma similar a la sangre de ensayo con la excepción de que se retiraron 50 ml de cada conejo. La sangre se incubó y se centrifugó como la sangre de ensayo.

Se determinó el volumen total de suero y se añadió un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se realizó una precipitación con sulfato amónico al 40% para retirar la proteína innecesaria y se incubó a 2-8°C durante 24 horas. La mezcla se transfirió a un tubo de centrífuga y se centrifugó a 10.000 xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en PBS hasta aproximadamente un tercio del volumen original. La suspensión se dializó frente a 200 veces el volumen total de suspensión de fosfato potásico 0,0175 M, pH 6,5 a 2-8°C. Después de la diálisis, la suspensión se centrifugó a 10.000 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante y se desechó el sedimento.

Una columna de DEAE (dietilaminoetil celulosa) se equilibró con fosfato potásico 0,0175 M, pH 6,5 a temperatura ambiente. El sobrenadante se puso sobre la columna y se recogieron fracciones del efluente. Se determinó la concentración de proteínas (DO_{280}) y se reunieron todas las fracciones con un valor mayor de 0,200. El anticuerpo obtenido se ensayó en el ELISA.

Ejemplo 3

Conjugación con peroxidasa de rábano picante

La conjugación usó 10 mg de anticuerpo anti-*H. pylori* de conejo purificado con DEAE. El anticuerpo se llevó a un volumen final de 2,5 ml por concentración o por la adición de bicarbonato sódico 10 mM pH 9,6. Una columna de PD-10 (Pharmacia) se equilibró con bicarbonato sódico 10 mM pH 9,6. El anticuerpo se añadió a la columna y se recogieron nueve fracciones de 1,0 ml. Se tomó una concentración de proteínas (DO_{280} E.O. = 1,4) de cada fracción y se reunieron las fracciones con lecturas superiores a 0,200. “ DO_{280} E.O. se refiere al coeficiente de extinción para una proteína dada, cuando se mide la densidad óptica de una solución al 1% que tiene una longitud de trayectoria de 1 cm, a una longitud de onda de 280 nm usando un espectrofotómetro”.

Otra columna PD-10 distinta se equilibró con acetato sódico trihidrato 1 mM pH 4,3. La cantidad mínima de peroxidasa de rábano picante (HRP) usada fue de 1,172 mg de HRP por cada mg de anticuerpo. Se pesó 1,5 veces la HRP mínima calculada y se añadió a 1,0 ml de agua desionizada. Se realizó una concentración de proteína (DO_{403} E.O. = 2,275) y la HRP se diluyó a 10 mg/ml con agua desionizada. Se añadió m-peryodato sódico 0,1 M a una concentración de 0,2 ml por cada 4 mg de HRP. Se dejó que esta reacción procediera durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción se detuvo por medio de la adición de 50 μ l de etilenglicol 2 M por cada ml de HRP a 4 mg. La HRP se eluyó a través de la columna PD-10 con acetato sódico trihidrato 1 mM pH 4,3.

La relación de conjugación fue 1 mg de anticuerpo por 1,172 mg de HRP. El anticuerpo se ajustó con bicarbonato sódico 10 mM pH 9,6 y la HRP con acetato sódico trihidrato 1 mM pH 4,3. Los dos se mezclaron en un matraz especializado y el pH se ajustó a 9,6 con bicarbonato sódico 0,2 M, pH 9,6. Protegida de la luz, la mezcla se incubó durante dos horas en un rotor a 85-95 rpm a temperatura ambiente. Después de dos horas, se añadieron 0,1 ml de borohidruro sódico a una concentración de 4 mg/ml por cada 8 mg de anticuerpo. La nueva mezcla se incubó a 4°C durante dos horas en un rotor. El conjugado se pasó a través de una columna PD-10, equilibrada con PBS, y se recogieron las fracciones que contenían el conjugado. Las fracciones se reunieron y se concentraron hasta aproximadamente 1,0 ml. El concentrado se puso en una columna Sephracryl S-200 (Marca Comercial Registrada) equilibrada con PBS a un caudal de 10 ml/h. Se recogieron fracciones de 2,0 ml y se realizó una concentración de proteína tanto del anticuerpo como de la HRP. Se reunieron las fracciones con un pico simultáneo tanto en la DO_{280} como en la DO_{403} y se concentraron hasta aproximadamente 1,0 mg/ml.

El Ejemplo 4 presentado a continuación ilustra el denominado ensayo “progresivo” en el que el anticuerpo unido al soporte primero se pone en contacto con la muestra que se va a ensayar para extraer el antígeno de la muestra por medio de la formación de un complejo de anticuerpo/antígeno y por medio del contacto del complejo con una cantidad conocida de anticuerpos marcados. Sin embargo, los especialistas en la técnica apreciarán que el ensayo inmunométrico también puede realizarse como un denominado ensayo “simultáneo” o “inverso”. Un ensayo simultáneo implica una sola etapa de incubación, ya que el anticuerpo unido al soporte sólido y el anticuerpo marcado se añaden a la muestra a ensayar al mismo tiempo. Después de completar la incubación, el soporte sólido se lava para eliminar la muestra residual y el anticuerpo marcado no complejado. Después se determina la presencia del anticuerpo marcado asociado con el soporte sólido. Un ensayo inverso implica la etapa de adición por etapas primero de una solución de anticuerpo marcado a la muestra fecal seguida de la adición del anticuerpo no marcado unido al soporte. Después de una segunda incubación, el soporte se lava de forma convencional para liberarlo de la muestra residual y del anticuerpo marcado sin reaccionar.

ES 2 132 044 T5

Ejemplo 4

Ensayo ELISA

5 El anticuerpo se diluyó en PBS en serie entre 20 $\mu\text{g/ml}$ y 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Se añadió una alícuota de 0,100 ml de cada dilución a una tira Immulon-II (Dynatech), se cubrió y se incubó durante una noche a temperatura ambiente. La placa se lavó una vez con PBS/Tween. Se bloqueó con BSA al 1%/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo, se lavó una vez con PBS/Tween. Varias muestras positivas y negativas se diluyeron 1:5 en BSA al 0,1%/PBS. Cada muestra (0,100 ml) se añadió a un pocillo de las tiras, se cubrió y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

10 La placa después se lavó 5 veces con Merifluor C/G. Un anticuerpo anti-*H. pylori* de conejo aceptado previamente conjugado con peroxidasa de rábano picante se diluyó a 10 $\mu\text{g/ml}$ y se añadieron 0,100 ml a cada pocillo. La placa se cubrió y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. De nuevo, se lavó 5 veces con PBS/Tween y después se reveló durante 10 minutos a temperatura ambiente con 0,100 ml de solución de trimetilbencidina (TMB). La reacción se interrumpió con 0,050 ml de $2\text{NH}_2\text{SO}_4$ y se leyó después de dos minutos. La dilución que produjo la señal máxima

15 y el menor efecto de fondo se eligió como la dilución óptima.

Pueden realizarse determinaciones cuantitativas comparando la medición del anticuerpo marcado con la obtenida para calibrar muestras que contienen cantidades conocidas de antígeno. La Tabla 1 presentada a continuación muestra la densidad óptica obtenida cuando se ensayan cuatro muestras, conteniendo cada una un número predeterminado de

20 organismos.

TABLA 1

	No. de organismos por ml	$\text{DO}_{450/630}$
25	3×10^7	2,547
30	$1,9 \times 10^7$	0,662
	$4,6 \times 10^6$	0,182
35	$1,1 \times 10^6$	0,038

En la Tabla 2 se presentan los resultados del ensayo de seis muestras clínicas.

	Muestra	$\text{DO}_{450/630}$	Resultado
40	1	0,301	Positivo
45	2	0,713	Positivo
	3	0,284	Positivo
	4	0,005	Negativo
50	5	0,033	Negativo
	6	0,008	Negativo

55 También pueden usarse los denominados ensayos de sándwich triple para detectar *H. pylori* en muestras fecales de acuerdo con la invención. Los ensayos triples se conocen en la técnica y puede aplicarse la metodología básica para la detección de *H. pylori* en muestras fecales. Un ensayo triple típicamente se realiza dispersando una muestra fecal que se sospecha que contiene *H. pylori* en un diluyente de muestra que minimice la reactividad cruzada y añadiendo la muestra diluida a un anticuerpo inmovilizado contra *H. pylori* que se ha obtenido a partir de una primera especie de

60 un animal productor de anticuerpos. La muestra se incuba para formar el complejo anticuerpo-antígeno. Después de lavar el exceso de muestra del soporte inmovilizado, se añade al complejo de anticuerpo-antígeno un anticuerpo contra *H. pylori* conocido como anticuerpo primario y obtenido a partir de una segunda especie de un animal productor de anticuerpos, y la mezcla se incuba para formar un complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Después de formar este complejo y de retirar el anticuerpo que no ha reaccionado, el complejo se hace reaccionar con un anticuerpo conocido

65 como anticuerpo secundario, que es un anticuerpo contra la segunda especie productora de anticuerpos tal como una inmunoglobulina anti-conejo, anti-vaca o anti-cabra. El anticuerpo secundario se marca de una forma convencional, típicamente con una enzima, y se incuba con el complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo para formar un triple

ES 2 132 044 T5

complejo de anticuerpo o sándwich. Después de retirar el anticuerpo secundario que no ha reaccionado, el antígeno se ensaya de forma convencional. Para usar un marcador enzimático, se añade un sustrato al complejo del antígeno y los tres anticuerpos, y la reacción del sustrato con la enzima unida se controla para determinar la cantidad de antígeno presente en la muestra. En el ensayo de sándwich triple, al igual que en el ensayo de sándwich básico, los lavados y las soluciones de anticuerpo se formulan o tamponan para controlar la reactividad cruzada cuando es necesario.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la determinación de *H. pylori* en una muestra fecal, que comprende:

5 (a) dispersar una muestra fecal que se sospecha que contiene *H. pylori* en un diluyente de muestra;

(b) poner en contacto la muestra fecal en el diluyente con un primer anticuerpo policlonal contra el antígeno de *H. pylori* para formar un complejo del anticuerpo y el antígeno;

10 (c) separar dicha muestra de dicho complejo;

(d) exponer el complejo a un segundo anticuerpo policlonal contra dicho antígeno y contra una porción del anticuerpo que reacciona con dicho complejo, estando unido uno de dichos primer y segundo anticuerpos a un soporte sólido y estando marcado el otro anticuerpo con un agente de detección, y

15 (e) determinar la presencia del anticuerpo marcado y, a su vez, determinar la presencia del antígeno de *H. pylori* en dicha muestra fecal.

20 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer anticuerpo está unido a un soporte sólido y el segundo anticuerpo está marcado con un agente de detección.

25 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer anticuerpo está marcado con un agente de detección seleccionado preferiblemente entre fosfatasa alcalina, beta galactosidasa y peroxidasa de rábano picante, y el segundo anticuerpo está unido a un soporte sólido.

30 4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el diluyente de la muestra es un diluyente basado en proteínas, preferiblemente un diluyente que contiene una proteína seleccionada entre suero bovino fetal, suero normal de cabra, suero de cobaya, suero de caballo, caseína, albúmina, gelatina y albúmina de suero bovino.

5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo policlonal se obtiene por medio de la sensibilización de un mamífero no humano productor de anticuerpos con células *H. pylori*.

35 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células proceden de una pluralidad de cepas de *H. pylori*.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichas células son células de la cepa ATCC 43504.

40 8. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que después de exponer el complejo al segundo anticuerpo, el complejo se lava con un tampón que reduce la reactividad cruzada o mejora de otra forma la especificidad del ensayo.

45 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho lavado se realiza con solución salina tamponada con fosfato.

10. Un procedimiento para la determinación de *H. pylori* en una muestra fecal, que comprende:

50 (a) dispersar una muestra fecal que se sospecha que contiene *H. pylori* en un diluyente de muestra;

(b) poner en contacto la muestra fecal en el diluyente con un primer anticuerpo policlonal contra el antígeno de *H. pylori* unido a un soporte sólido y un segundo anticuerpo policlonal marcado contra *H. pylori* para formar un complejo de los anticuerpos y el antígeno;

55 (c) separar dicha muestra y dicho complejo; y

(d) determinar la presencia del anticuerpo marcado y, a su vez, determinar la presencia del antígeno de *H. pylori* en dicha muestra fecal.

60 11. Un procedimiento para la determinación de *H. pylori* en una muestra fecal, que comprende:

(a) dispersar una muestra fecal que se sospecha que contiene *H. pylori* en un diluyente de muestra;

65 (b) poner en contacto la muestra fecal en el diluyente con un primer anticuerpo policlonal contra el antígeno de *H. pylori* producido por una primera especie productora de anticuerpos y unido a un soporte sólido para formar un complejo del anticuerpo y el antígeno;

ES 2 132 044 T5

(c) separar dicha muestra y dicho complejo;

(d) poner en contacto el complejo de antígeno-anticuerpo formado en la etapa (b) con un anticuerpo policlonal primario contra el antígeno de *H. pylori* obtenido a partir de una segunda especie productora de anticuerpos, para producir un complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo;

(e) retirar el anticuerpo primario no presente en el complejo de la etapa (d);

(f) poner en contacto el complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo formado en la etapa (d) con un anticuerpo secundario, siendo dicho anticuerpo secundario un anticuerpo contra la segunda especie productora de anticuerpos, formando dicho anticuerpo secundario un complejo con dicho complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo; y

(g) determinar la presencia del antígeno de *H. pylori* en dicha muestra fecal.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65