



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 227**

51 Int. Cl.:
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01986945 .2**
86 Fecha de presentación : **21.12.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1344059**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

54 Título: **Dispositivo de ensayo de flujo a través, kit de diagnóstico que comprende dicho dispositivo y uso en la detección de un analito en una muestra.**

30 Prioridad: **22.12.2000 EP 00870321**
02.02.2001 US 266236 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **BIO A.R.T. S.A.**
avenue Joseph Wybran 40
1070 Bruxelles, BE

72 Inventor/es: **Fannes, France**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 295 227 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

Dispositivo de ensayo de flujo a través, kit de diagnóstico que comprende dicho dispositivo y uso en la detección de un analito en una muestra.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la detección de un analito presente en una muestra, y a un método para recubrir un material poroso insoluble con un compuesto o complejo de unión a analito.

10 Antecedentes de la invención

El número de dispositivos inmunocromatográficos rápidos basados en membranas en el mercado está aumentando continuamente a un ritmo muy veloz. Los principales factores que están contribuyendo a este crecimiento incluyen las mejoras en la tecnología de los conjugados y un entendimiento creciente entre los desarrolladores de productos de los principios de diseño general implicados. Aunque los dispositivos inmunocromatográficos actuales vienen en una amplia variedad de diseños con una variedad diversa de alojamientos, la mayoría de las pruebas disponibles comúnmente se basan en uno de dos formatos simples.

El formato más común es el diseño de flujo lateral o de tira reactiva, que ha llegado a ser familiar por su uso en ensayos en la consulta médica así como en pruebas sin prescripción médica. Un formato menos extendido es el diseño de flujo a través o de flujo transversal. Independientemente del formato que se esté usando, conseguir una prueba sensible y reproducible requiere que el fabricante tenga un procedimiento eficaz para aplicar un compuesto de unión a analito. Dicho compuesto de unión a analito puede unirse específicamente al analito que va a analizarse. Una prueba rápida es el ensayo basado en membranas, desechable, barato, que proporciona pruebas visuales de la presencia de un analito en una muestra.

Por definición, las pruebas rápidas proporcionan resultados en poco tiempo, preferiblemente minutos. Es un objeto de estas pruebas ser convenientes, precisas, fiables, baratas, desechables y sencillas de manejar. También pueden interpretarse preferiblemente de manera fácil y sin ambigüedades, incluso por usuarios sin mucha experiencia. Normalmente, se requieren tan sólo 200 μ l de muestra líquida para realizar la prueba, que se completa usualmente en el plazo de 2-5 minutos. No se requiere instrumentación para realizar estas pruebas, que pueden usarse en clínicas, laboratorios, ubicaciones de campo y en el domicilio (con frecuencia por personal inexperto). El sustrato base de una prueba rápida conocida es normalmente un tira de nitrocelulosa sobre la que está inmovilizado un compuesto de unión a analito, usualmente un anticuerpo o un antígeno. Una almohadilla que contiene conjugado seco está unida a la tira de membrana. Para la mayoría de las pruebas disponibles actualmente, esta almohadilla de conjugado contiene partículas de oro absorbidas con anticuerpos o antígenos específicos para el analito que está detectándose. Cuando la muestra se aplica al dispositivo, la muestra líquida migra mediante difusión capilar a través de la almohadilla de conjugado, rehidratando el conjugado de oro y permitiendo la interacción de la muestra con el conjugado.

Se introdujeron marcadores de oro en las pruebas rápidas basadas en membranas a finales de los años 80. Su estabilidad, sensibilidad y precisión superiores hacen que el oro sea adecuado para su uso en pruebas rápidas. Sin embargo, un conjugado de oro de alta calidad requiere el mayor cuidado y atención con el fin de conseguir un producto final estable y sensible. De hecho, muchos productos mal caracterizados, de poca calidad, conducen a resultados no reproducibles, no fiables. Para prevenir esto, han de evaluarse los coloides de oro ultraestructuralmente usando un microscopio electrónico de transmisión (MET). Una evaluación de este tipo debería permitir al fabricante comparar el diámetro de los coloides con el de patrones calibrados y obtener información sobre la esfericidad y la varianza global en el diámetro de partícula. Estar conformado uniformemente con un tamaño de partícula óptimo de 40 nm a 20 nm permitirá establecer ensayos fiables. Un mero 5% de partículas de forma irregular puede influir en el resultado de una prueba, haciéndola completamente irreproducible. Es por esta razón que la producción de tales partículas de oro de alta calidad es cara. Esto contrasta con la definición proporcionada anteriormente de que una prueba rápida debe ser un ensayo de bajo coste.

El documento EP 0 207 152 y la patente estadounidense número 5.958.790 dan a conocer un método para la determinación cualitativa o semicuantitativa de un analito en una muestra de prueba basándose en un principio de flujo a través que comprende un segundo compuesto de unión a analito que pasa a estar inmovilizado tras el contacto con la zona de reacción, mediante lo cual se está uniendo un marcador de oro coloidal al segundo compuesto de unión a analito. Una señal de color generada por el oro coloidal inmovilizado forma la señal visual. Además, la patente estadounidense número 5.616.467 define el tamaño óptimo de las partículas en 20 nm con el fin de aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad de la prueba.

Sin embargo, tal como se trató anteriormente, la reproducibilidad y la sensibilidad de tales pruebas a base de oro son bastante bajas. Es necesaria una optimización adicional para aumentar el rendimiento, la sensibilidad y reproducibilidad y reducir los costes de estos ensayos *in vitro*.

Del documento EP 0 458 231 se conocen dispositivos de inmunoensayo enzimático mediante los cuales se produce un complejo de estructura intercalada (sándwich). Se da a conocer un dispositivo de flujo a través en el que se produce un complejo de estructura intercalada usando ureasa como marcador. Se da a conocer una cascada de reacciones con

el fin de producir un depósito coloreado. Un problema principal es que dichos inmunoensayos enzimáticos conocidos requieren diversas etapas procedimentales tales como una cascada de reacciones con el fin de producir un depósito coloreado. Es un objeto de la presente invención reducir dicho mecanismo de reacción de múltiples etapas.

5 El documento EP 0 125 118 da a conocer un inmunoensayo mediante el cual se forman estructuras intercaladas unidas a enzimas sobre una superficie de tira reactiva y mediante el cual se forma un depósito insoluble. Se requieren varias etapas de lavado para obtener dicho depósito coloreado.

10 La patente estadounidense número 5.958.790 da a conocer un método para la determinación cualitativa o semicuantitativa de un analito en una muestra de prueba basándose en un principio de flujo a través mediante el cual se genera una señal visual mediante las partículas de oro coloidal inmovilizadas.

Objeto de la presente invención

15 Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una prueba barata, sencilla, veloz, reproducible, sensible que sea fiable para la detección de analitos en una muestra.

20 La presente invención usa conjugados o compuestos de unión a analito marcados con enzimas que pueden formar precipitados insolubles cuando está(n) presente(s) (un) analito(s) en una disolución de prueba en un sistema de flujo a través. Un objeto de la presente invención se refiere a una optimización adicional del concepto de prueba rápida a través de una consideración equilibrada de cada parámetro dando como resultado una prueba reproducible y sensible.

25 Un objeto principal de la presente invención es proporcionar un procedimiento fiable de una etapa, con el fin de obtener un depósito coloreado, integrado en el dispositivo de ensayo de flujo a través. El uso de un procedimiento de una etapa de este tipo permite generar un sistema de prueba más veloz, más sencillo, más barato, pero también mejorar la fiabilidad y reproducibilidad de la prueba correspondiente. De hecho, omitiendo etapas procedimentales, los errores, tales como errores de pipeteo o de manipulación, pueden pasar a ser limitados o incluso insignificantes. El uso de un procedimiento de detección de una etapa, tal como se propone en la presente invención, a diferencia del uso de un mecanismo de detección de reacción de múltiples etapas tal como se describe en el documento EP 0 458 231 da como resultado este efecto. Además, en el dispositivo/método/kit de la presente invención se omiten las etapas de lavado. Tales etapas de lavado son esenciales para la sensibilidad/reproducibilidad de la mayoría de las pruebas de la técnica anterior, por ejemplo documentos EP 0 458 231 y EP 0 125 118. Más allá de la mejora de las características mencionadas anteriormente, el dispositivo/método/kit de la presente invención permite también un registro permanente de los resultados, lo cual no es el caso cuando se usan partículas de oro. Un registro permanente permite al experto en la técnica usar los resultados obtenidos con resultados obtenidos de experimentos previos/posteriores. Esto hace que la comparación de resultados entre ensayos sea más sencilla y más fiable. Además, la producción de un kit según la patente estadounidense número 5.958.790 requiere más trabajo y es más cara y los resultados de prueba correspondientes son menos fiables. Como conclusión general, la presente invención describe un método más veloz, más sencillo, más barato que es más comparable, fiable y reproducible que los métodos de prueba ya conocidos.

40 Estos objetivos por separado, combinados parcialmente o todos juntos se han cumplido mediante la presente invención.

Sumario de la invención

45 Según la presente invención se proporciona un dispositivo de ensayo para someter a prueba la presencia de un analito en una muestra dada que comprende: un soporte de múltiples capas sobre el que se inmoviliza un primer compuesto de unión a analito o complejo de unión a analito, que puede unirse a dicho analito presente en dicha muestra, mediante el cual dicho analito puede unirse a un segundo compuesto de unión a analito marcado enzimáticamente o complejo de unión a analito marcado enzimáticamente que forma un complejo de estructura intercalada, mediante el cual dicho complejo de estructura intercalada puede generar, tras el contacto con un sustrato precipitante adecuado para dicho marcador enzimático, un depósito coloreado en un procedimiento de una etapa.

55 En la presente invención un “complejo” ha de entenderse de manera que el compuesto de unión a analito puede formar parte de un conglomerado de moléculas, mediante el cual uno o más compuestos presentes en este conglomerado pueden unirse al analito por separado o de manera cooperativa. Alternativamente, el analito también puede formar parte de un complejo que comprende uno o más analitos que podrían ser idénticos o diferentes. Los otros elementos en este conglomerado o complejo pueden ser péptidos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos o moléculas orgánicas.

60 Combinando el sistema de flujo a través con el uso de un sustrato precipitante específico, los inventores hallaron sorprendentemente que podían crearse condiciones de prueba sumamente fiables, veloces, sensibles y de alto rendimiento para la detección de analitos en una muestra de prueba, debido al hecho de que se obtiene directamente un depósito de color solamente en una etapa. Además, la producción de estos dispositivos de ensayo es sencilla y barata y no requiere una calidad extremadamente alta de los productos.

65 Otro objeto de la presente invención se refiere a una optimización adicional del concepto de prueba rápida a través de una consideración equilibrada de cada parámetro dando como resultado una prueba reproducible y sensible tal como composición de la membrana, tamaño de poro de la membrana, optimización del sistema de reactivo marcado

ES 2 295 227 T3

para detectar el analito, composición del tampón de recubrimiento, elección del compuesto de unión a analito, procedimiento de aplicación, nuevo procedimiento de bloqueo (tras el recubrimiento mediante inmersión durante un par de horas no se ha descrito anteriormente), almacenamiento y estabilidad de la membrana, estabilidad de los resultados, costes. A través de este procedimiento de optimización pueden omitirse todas las etapas de lavado que eran necesarias anteriormente para aclarar las señales de fondo, lo que hace que la prueba no sea sólo más barata, sino también más sencilla y más veloz que los sistemas prueba descritos hasta el momento.

El presente sistema de flujo a través permite un enfoque de “alto rendimiento” que puede ser necesario cuando se necesita analizar un gran número de muestras. La invención descrita también permite someter a prueba de manera reproducible muestras de prueba, lo que puede ser esencial cuando se usa para un diagnóstico clínico. Los inventores hallaron que la sensibilidad del ensayo usando el dispositivo tal como se describe mediante la invención es comparable con la condición más optimizada, tal como se describió para las pruebas a base de oro. Estos dispositivos pueden usarse para una amplia gama de aplicaciones, no sólo para aplicaciones clínicas sino también para aplicaciones de agricultura, medioambiente y veterinarias. Tales pruebas pueden realizarse fuera del laboratorio sin equipo de laboratorio por parte de médicos, técnicos de laboratorio o personal menos formado.

En resumen, la presente invención se refiere a un dispositivo de ensayo que cumple con los requerimientos que son esenciales para la aceptación de tales pruebas en el mercado: facilidad de uso, pequeños volúmenes de muestra, celeridad, es decir en el plazo de 3-5 minutos, fiabilidad y bajo precio de venta. Además, estas pruebas también presentan las mismas prestaciones técnicas, es decir alta sensibilidad y especificidad, estabilidad a largo plazo como las proporcionadas por las pruebas realizadas con instrumentos en el laboratorio.

Según la presente invención, dicho soporte de múltiples capas de dicho dispositivo de ensayo de la invención tal como se describió anteriormente comprende:

- a) una capa de cubierta superior de un material impermeable al agua que tiene al menos un orificio, mediante lo cual dicho orificio está expuesto al menos parcialmente a una zona de prueba,
- b) una capa porosa intermedia que comprende al menos un material poroso insoluble sobre el que puede unirse el primer compuesto de unión a analito en dicha zona de prueba, y
- c) una capa absorbente inferior que comprende al menos una capa de un material hidrófilo.

Según la presente invención, el material impermeable al agua de dicha capa de cubierta superior tal como se definió anteriormente se elige de plástico adaptado a la muestra que va a someterse a prueba que comprende polipropileno, poli(cloruro de vinilo) o estireno-etileno/butileno-estireno (SEBS) (Rubin (1990), Schouten y van der Vegt (1987)). Esto evita las señales de fondo indeseadas provocadas por la interacción hidrófoba o hidrófila de algunos de los componentes presentes en una muestra con el plástico.

El dispositivo de ensayo de la presente invención comprende al menos un orificio en el material impermeable al agua que tiene un diámetro de al menos 1 mm que recubre una zona de prueba. El orificio limita la superficie de la membrana porosa a la que está expuesta la muestra y, cuando se colocan grandes volúmenes sobre este dispositivo de múltiples capas, el orificio también ayuda a que el área definida por el orificio absorba el líquido. El orificio no está limitado por el tamaño de la zona de prueba. Tanto la zona de orificio como de prueba pueden tener cualquier forma tal como un círculo, cuadrado, triángulo, cruz o cualquier superficie regular o irregular.

La zona de prueba es parte de la capa porosa en la que se ha colocado el primer compuesto de unión a analito o molécula de captura. La zona de prueba puede estar entre 1 y 10 mm de ancho. Es posible una zona de prueba con un tamaño inferior a 1 mm, pero en tal caso la interpretación, es decir la lectura de los resultados puede ser difícil. Es posible una zona de prueba con un tamaño superior a 10 mm, pero en tal caso se necesita más volumen de reactivos. Sin embargo, en algunos casos, el uso de una zona de prueba grande es crucial, por ejemplo para el análisis de muestras de alimentos. La absorción de un volumen de muestra mayor, por ejemplo desde 0,1 ml hasta 2 ml puede permitir que se detecte la concentración sobre la membrana del analito. Dicha zona de prueba puede tener un diámetro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 mm. Preferentemente dicha zona de prueba tiene un diámetro de 3 a 4 mm. Para una zona de este tipo se usan preferentemente volúmenes de muestra de entre 5 y 500 μ l. El volumen de la muestra añadido es preferentemente igual o inferior al volumen de la disolución de reactivo. Por ejemplo, si se aplica una muestra de 15 μ l, se usan 25 μ l de la disolución de reactivo; cuando se usan 25-30 μ l de muestra, se aplican 50 μ l de la disolución de reactivo. Si la zona de prueba es superior a 4 mm o si los volúmenes de muestra son mayores a 100 μ l, la composición del tampón diluyente puede modificarse mediante la adición de sacarosa desde el 1% hasta el 40%. Concentraciones posibles son el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40%. La sacarosa puede añadirse al tampón diluyente con el fin de ralentizar el fenómeno de velocidad de flujo con el fin de conseguir un límite de detección inferior y evitar la aparición de una mancha coloreada heterogénea.

El dispositivo de ensayo de la presente invención comprende, preferiblemente una capa porosa insoluble intermedia a la que está unido un compuesto de unión a analito o una molécula de captura. Esta capa puede filtrar suspensiones complejas, por ejemplo material celular de una muestra que se está sometiendo a ensayo si el analito está asociado con el material celular. En este último caso, la membrana o el filtro se selecciona para que tenga un tamaño de poro

que permita esta separación. Puede usarse cualquiera de una variedad de elementos de filtración incluyendo filtros de fibra de vidrio y filtros de diversos materiales sintéticos o naturales. Según la presente invención, el material poroso insoluble intermedio se elige de un grupo que comprende nailon, nitrocelulosa, celulosa, fibra de vidrio, polisulfona, poli(difluoruro de vinilideno), poliéster o cualquier otro material polimérico al que puedan unirse las sustancias biológicas. Preferentemente, el material poroso insoluble intermedio es nitrocelulosa (Advanced Microdevices (PVT) LTD. 21, Industrial Area, Ambala Cantt, 133 001 India). Además, la presente invención sugiere que el material poroso insoluble intermedio tenga poros con un diámetro de entre 0,1 y 12 μm y tenga un espesor de hasta 2500 μm . Puede usarse membranas con tamaños de poro de 0,1, 0,2, 0,45, 0,8, 1,2, 3,0, 5,0, 8,0 y 12 μm . Las membranas con tamaños de poro de 0,45, 0,8, 1,2 μm son las más relevantes; se usan preferentemente membranas con poros de 0,45 μm y un espesor de 500 μm . El espesor de la membrana parece influir en la velocidad de flujo y en la calidad de los resultados.

Todas estas realizaciones de la presente invención se basan en pruebas experimentales tal como se describen en la sección de ejemplos.

En la presente invención, la membrana porosa insoluble intermedia es una capa tal como una membrana o un filtro al que puede unirse un máximo del primer compuesto de unión a analito o molécula de captura. En algunos casos, puede ser necesario no cargar un máximo de este primer compuesto de unión a analito o molécula de captura en esta superficie. El término “unido” en la presente invención pretende abarcar cualquier medio para fijar el primer compuesto de unión a analito o molécula de captura al elemento poroso. Además, este término incluye todos los medios que pueden usarse para establecer una unión covalente y no covalente. El material del elemento poroso se selecciona de un material al que puede unirse el compuesto de unión a analito o, si se usa, la molécula de captura. La invención no excluye la posibilidad de unir el analito inmediatamente sobre esta superficie porosa.

En caso de elegir un enlace covalente y que las moléculas que van a unirse sean proteicas, por ejemplo, anticuerpos o antígenos, la membrana porosa tiene residuos de grupo amino o en los que tales grupos se han introducido mediante medios químicos. Los grupos amino permiten que una proteína se acople a ella mediante el método bien conocido del glutaraldehído. Alternativamente, los anticuerpos pueden acoplarse a las fibras de vidrio a través de aminosilanos. También puede usarse otros materiales naturales o sintéticos que pueden acoplarse directamente o a través de productos intermedios a un compuesto de unión a analito.

Aunque el enlace covalente del primer compuesto de unión a analito o la molécula de captura podría garantizar una situación más estable del ensayo, mediante la presente invención se muestra que el uso de enlaces no covalentes en un sistema de flujo a través también da como resultado condiciones de ensayo fiables. Como los enlaces no covalentes se basan en la carga o interacción hidrófoba, es más fácil y menos laborioso realizar tales enlaces. Por tanto, una realización preferida de la presente invención es recubrir el primer compuesto de unión a analito o la molécula de captura no covalentemente sobre dicho elemento poroso insoluble intermedio del dispositivo de ensayo.

El recubrimiento de la capa porosa con el primer compuesto de unión a analito o de captura se realiza preferentemente por medio de inmersión de la capa en disoluciones de recubrimiento y tras el recubrimiento seguido por un procedimiento de secado. Sin embargo, alternativamente puede usarse un proceso de manchado o de pulverización para la unión de moléculas con alta afinidad.

Preferiblemente, la preparación de anticuerpos comprende un anticuerpo monoclonal aunque pueden usarse anticuerpos policlonales procedentes de antisueros. A este respecto también pueden usarse preparaciones de anticuerpos brutas para este fin. Las técnicas para la preparación y/o purificación de anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen ahora bien y no requieren ninguna cita en este caso.

En aún otra realización de la invención, el elemento poroso del dispositivo de la presente invención puede tener moléculas de captura unidas a él. Tal como se usa en el presente documento, el término “molécula de captura” pretende hacer referencia a agentes que se unirán de manera selectiva al primer compuesto de unión a analito. El uso de una molécula de captura unida al elemento poroso hace posible simplificar el desarrollo y la preparación del elemento poroso útil en ensayos de ligando-receptor. En este caso, “ligando” se define como el analito, “receptor” puede definirse como el compuesto de unión a analito. Por ejemplo, si un compuesto de unión a analito está unido al elemento poroso, puede ser necesario modificar el procedimiento de unión con el fin de optimizar la unión de cada compuesto de unión a analito requerida para un panel de ensayos. Sin embargo, una única molécula de captura o una mezcla de múltiples moléculas de captura o una mezcla de múltiples compuestos de unión a analito tales como antígenos o anticuerpos unidos al elemento poroso pueden emplearse en una pluralidad de ensayos. Como resultado, el esfuerzo de desarrollo y los procedimientos de fabricación pueden simplificarse enormemente cuando un elemento poroso “universal” de este tipo es posible. Por consiguiente, dependiendo de la estrategia usada, el recubrimiento del primer compuesto de unión a analito puede situarse antes o después del montaje del dispositivo de ensayo y puede llevarse a cabo por el fabricante o por la persona que realiza el ensayo. Además, el montaje del propio dispositivo puede realizarlo también la persona que lleva a cabo el ensayo.

La capa inferior del dispositivo de la presente invención es una capa o elemento absorbente que tiene conductos capilares generalmente transversales a las superficies superior e inferior. La capa absorbente inferior se monta con la capa porosa intermedia de una manera que permite la comunicación directa entre los poros o intersticios de la capa porosa y los capilares de la capa absorbente. Por tanto, cuando se aplica un líquido sobre la capa porosa intermedia y se absorbe posteriormente por la capa absorbente inferior y la satura, el líquido se extrae mediante fuerza capilar

hacia el elemento absorbente. Como resultado, puede inducirse el flujo a través de la capa absorbente inferior cuando se aplica una muestra líquida a la superficie de la capa porosa intermedia aunque la presión hidrostática del fluido sea tan baja que sin ayuda no podría fluir a través de la capa intermedia sin la aplicación de presión para forzarla a través o a vacío para extraerla a través. La capa absorbente comprende al menos una capa de material hidrófilo en contacto con y colocado en el lado de la capa porosa insoluble opuesta al lado de la capa de cubierta.

La selección de material para la capa absorbente no es crítica y puede usarse una variedad de materiales de filtro fibrosos. Un material útil son las fibras de acetato de celulosa orientadas como en un filtro de cigarrillo. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse otros elementos absorbentes fabricados de poliéster, poliolefina u otros materiales en lugar de acetato de celulosa. La presente invención sugiere que el material hidrófilo del dispositivo permite la comunicación entre el material poroso y la capa absorbente y es preferentemente AP120, proporcionado por la empresa mdi (Advanced Microdevices (PVT) LTD. 21, Industrial Area, Ambala Cantt, 133 001 India). Alternativamente, pueden usarse almohadillas de filtro equivalentes. Estas almohadillas de filtro o capas absorbentes pueden proporcionarse por varias empresas involucradas en la tecnología de membrana, por ejemplo Schleicher & Schuell, Sartorius y Millipore.

Tal como ya se mencionó anteriormente, según la presente invención dicho primer y segundo compuestos de unión a analito son sustancias que se unen específicamente al analito y se eligen de un grupo que comprende péptidos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y moléculas orgánicas. Cuando el elemento poroso tiene un primer compuesto de unión a analito unido a él, el compuesto de unión a analito se selecciona por su capacidad para unirse directamente de manera selectiva con el analito. Por ejemplo, si el analito es un antígeno, el compuesto de unión a analito puede ser un anticuerpo, monoclonal o policlonal que se une específicamente al analito, preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Si el analito es un anticuerpo, el compuesto de unión a analito puede ser un antígeno o anticuerpo. Si el analito es una enzima, el compuesto de unión a analito puede ser un receptor o un sustrato para la enzima. Si el analito es un ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN, el receptor puede ser un oligómero complementario de ADN o ARN o una proteína de unión a ácido nucleico.

Preferentemente, dicho primer compuesto de unión a analito y/o dicho segundo compuesto de unión a analito son un anticuerpo que se une específicamente al analito. A este respecto, la presente invención también define dicho anticuerpo como preferentemente un anticuerpo monoclonal o policlonal o una preparación de anticuerpo del mismo. El término “unión específica” implica que sustancialmente no hay reacción cruzada del anticuerpo con otras proteínas. El término “preparación de anticuerpo” cubre cualquier disolución que contiene anticuerpos tales como suero o disoluciones que contienen cualquier derivado de anticuerpo. Los anticuerpos según la invención pueden producirse según técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando tecnología de hibridoma convencional tal como se describe por Kohler y Milstein (1979) (Kohler, F. y Milstein, C. 1995. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.). Los anticuerpos policlonales también pueden prepararse usando tecnología convencional bien conocida por los expertos en la técnica, y que comprende inocular un animal huésped, tal como un ratón, con una proteína o un epítipo según la invención y recuperar el suero inmunitario. La presente invención también incluye fragmentos de anticuerpos completos que mantienen su actividad de unión, tales como por ejemplo fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂ así como anticuerpos monocatenarios.

La presente invención trata además que el primer compuesto de unión a analito pueda estar acoplado directa o indirectamente a la capa porosa del dispositivo. Cuando está acoplado indirectamente, el dispositivo se recubre en primer lugar con una molécula de captura tal como se describió anteriormente que se une específicamente al primer compuesto de unión a analito seguido por el recubrimiento del primer compuesto de unión a analito. Por ejemplo, si el analito es un antígeno y el primer compuesto de unión a analito es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG de ratón, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, el elemento de captura puede ser un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, frente a la IgG murina. En otros casos, el primer compuesto de unión a analito puede estar conjugado con un resto que se une de manera selectiva con la molécula de captura. Por ejemplo, el resto puede ser un hapteno y la molécula de captura un anticuerpo frente a dicho hapteno. Un hapteno posible es la fluoresceína. En otros casos, la molécula de captura puede ser avidina o estreptavidina. En tal caso, el primer compuesto de unión a analito tendrá biotina unida a él. En otros casos, el primer compuesto de unión a analito puede ser un oligómero de ácido nucleico, o tener un oligómero de este tipo unido a él, y la molécula de captura puede ser un segmento de ácido nucleico complementario a una parte del primer oligómero de unión a analito que no afecta a la unión con el analito. Los expertos en la técnica apreciarán a partir de lo anterior que puede emplearse una variedad de combinaciones de molécula de captura/primer compuesto de unión a analito.

Según la presente invención, el segundo compuesto de unión a analito está marcado con una enzima que, tras la interacción con un sustrato precipitante, da como resultado en una etapa un depósito coloreado. Es el uso de un sustrato precipitante de este tipo en un dispositivo de ensayo definido de este tipo tal como se describe mediante la invención lo que hace que el análisis del analito dentro de una muestra de prueba sea barato, sencillo, estable y fiable. Este segundo compuesto de unión a analito también puede denominarse “conjugado”.

Por analogía con el uso de una molécula de captura tal como se describió anteriormente, la presente invención también se refiere a un dispositivo de ensayo de diagnóstico en el que el analito se detecta indirectamente mediante el uso de una molécula de detección. De hecho, es posible que dicho segundo compuesto de unión a analito esté unido adicionalmente mediante una molécula de detección marcada con una enzima diferente (E2) de la enzima presente

ES 2 295 227 T3

en el segundo compuesto de unión a analito (E1), mediante lo cual esta enzima E2 tras la interacción con un sustrato precipitante usando un procedimiento de una etapa da como resultado un depósito coloreado. De esta manera, puede obtenerse la amplificación de la señal.

- 5 Alternativamente, dicho segundo compuesto de unión a analito no está marcado enzimáticamente y está unido adicionalmente mediante una molécula de detección marcada con una enzima que, tras la interacción con un sustrato precipitante usando un procedimiento de una etapa, da como resultado un depósito coloreado.

10 El acoplamiento indirecto del primer compuesto de unión a analito o la detección indirecta del segundo compuesto de unión a analito pueden realizarse por medio de una interacción avidina/biotina, estreptavidina/biotina, anticuerpo/antígeno, anticuerpo/hapteno, receptor/ligando, azúcar/lectina, ácido nucleico complementario, es decir ARN o ADN, o una combinación de los mismos, enzima/sustrato, enzima/cofactor, enzima/inhibidor o inmunoglobulina/proteína A estafilocócica.

15 Según la presente invención, dicha muestra de prueba puede elegirse de un grupo que comprende fracciones celulares, suero, sangre completa, orina, plasma, es decir, para pruebas diagnósticas en animales o seres humanos; tierra, barro, minerales, agua, aire, es decir, para pruebas ambientales; cualquier material alimenticio, es decir, para pruebas de alimentos; o cualquier otro medio/suspensión/material rígido que pueda usarse para uno de estos fines. El medio analizado puede ser de naturaleza tanto sólida como líquida. Resulta evidente que cuando se usan materiales sólidos, 20 éstos se disuelven en primer lugar en una disolución adecuada. Según la invención, esta disolución no es siempre un “tampón” real con al menos 2 componentes bien equilibrados. Puede ser una disolución hipotónica fuerte tal como NaCl solo o una disolución de extracción tal como con alcohol.

Según la presente invención, dicha muestra de prueba puede aplicarse sin diluir o en una forma diluida usando un 25 tampón diluyente y para la que el factor de dilución está adaptado al analito que va a detectarse (reivindicación 23). Dicha dilución puede variar desde 1/2 hasta 100.000. Son posibles las diluciones de 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35, 1/40, 1/45, 1/50, 1/55, 1/60, 1/65, 1/70, 1/75, 1/80, 1/85, 1/90, 1/95, 1/100, 1/150, 1/200, 1/250, 1/300, 1/350, 1/400, 1/450, 1/500, 1/550, 1/600, 1/650, 1/700, 1/750, 1/800, 1/850, 1/900, 1/950, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/1750, 1/2000, 1/2250, 1/2500, 1/2750, 1/3000, 1/3250, 1/3500, 1/3750, 1/4000, 1/4250, 1/4500, 30 1/4750, 1/5000, 1/5250, 1/5500, 1/5750, 1/6000, 1/6250, 1/6500, 1/6750, 1/7000, 1/7250, 1/7500, 1/7750, 1/8000, 1/8250, 1/8500, 1/8750, 1/9000, 1/9250, 1/9500, 1/9750, 1/10.000, 1/11250, 1/11500, 1/11750, 1/12000, 1/12250, 1/12500, 1/12750, 1/13000, 1/13250, 1/13500, 1/13750, 1/14000, 1/14250, 1/14500, 1/14750, 1/15000, 1/15250, 1/15500, 1/15750, 1/16000, 1/16250, 1/16500, 1/16750, 1/17000, 1/17250, 1/17500, 1/17750, 1/18000, 1/18250, 1/18500, 1/18750, 1/19000, 1/19250, 1/19500, 1/19750, 1/20.000, 1/30.000, 1/40.000, 1/50.000, 1/60.000, 1/70.000, 35 1/80.000, 1/90.000 y 1/100.000. La dilución usada depende de qué muestra se usa. Por ejemplo, para aplicaciones serológicas, es decir muestras que proceden de orina, suero, plasma o fracciones celulares, el intervalo de dilución puede ser desde sin diluir hasta 1/200; para aplicaciones microbiológicas, por ejemplo detección de contaminación microbiológica en alimentos y agua, el intervalo de dilución puede extenderse hasta 1/10.000. Resulta evidente que para muestras que portan altas cantidades del analito o cuando se usa un compuesto de unión a analito que tiene una 40 alta afinidad por el analito, pueden realizarse diluciones de hasta 100.000.

Dicho tampón diluyente tiene la función de diluir la muestra, pero en ciertos casos también el efecto sobre la 45 presentación mejorada del analito que han de reconocerse por el compuesto de unión a analito. Por tanto, puede incluirse un agente solubilizante tal como EDTA o SDS.

Además, según el/los analito(s) que han de detectarse, es necesario adaptar la composición del tampón diluyente de la(s) muestra(s) para la detección del analito. Por ejemplo, si la muestra que va a someterse a prueba se aísla de 50 alimentos, puede requerirse un proceso de sonicación con el fin de disolver agregados; si la muestra que va a someterse a prueba se aísla a partir de orina, puede ser necesario un ajuste de pH; si la muestra contiene lípidos, es decir “muestra de grasa”, puede solicitarse una deslipidación. Puede solicitarse una disolución hemolítica con el fin de someter a hemólisis los glóbulos rojos. En algunos casos, es necesario adaptar la salinidad. Todas las medidas enumeradas pueden ser necesarias para prevenir la obstrucción del sistema o para optimizar la condición en la que es necesario unir el 55 analito a los compuestos de unión a analito. Otros ejemplos de tales adaptaciones son para la aplicación en seres humanos: una muestra de líquido sinovial para la detección de factores reumatoides ha de tratarse con hialuronidasa. Para aplicaciones microbiológicas: una muestra de alimentos para la detección de agentes contaminantes ha de enriquecerse en ocasiones mediante la adición de algunas sustancias nutritivas o lisarse mediante la adición de agentes líticos al tampón diluyente. El tampón diluyente también puede comprender un conservante tal como timerosal o azida sódica.

Según la presente invención, dicho analito es un compuesto de manera anómala o normalmente presente o ausente 60 en la muestra. Así, los dispositivos según la presente invención pueden usarse para detectar la ausencia o presencia de un analito en una muestra; no obstante, también pueden aplicarse para evaluar la cantidad de un determinado analito en un medio, mediante lo cual puede estudiarse una disminución o un aumento en la concentración de analito. Si el dispositivo según la invención se usa para diagnosticar una enfermedad, entonces el analito es un compuesto celular de origen o bien intracelular, de membrana o bien extracelular. En este caso, el término “de manera anómala” implica 65 que la presencia *per se*, un aumento o una disminución del nivel presente o la ausencia del analito es indicativo de una enfermedad. Ejemplos de analitos que están “normalmente presentes” son HL y TSH; éstos están normalmente presentes y pueden aumentar o disminuir de manera anómala en ciertas enfermedades. Según la presente invención, dicho compuesto se selecciona del grupo que comprende antígenos y anticuerpos; mediante lo cual dicho antígeno

puede elegirse del grupo que comprende cualquier agente biológico tal como bacterias, virus, mohos, micobacterias, parásitos, patógenos; o moléculas tales como péptidos, proteínas, lípidos, moléculas orgánicas, oligómeros de ácido nucleico.

5 Según la presente invención, dicho antígeno puede elegirse del grupo que comprende proteínas para las que el nivel aumenta de manera anómala en ciertos estados patológicos o aumenta de manera anómala en material alimenticio.

Según la presente invención, dicho antígeno puede ser una bacteria o una toxina producida por una bacteria en material alimenticio o en fluidos biológicos. Ejemplos son: *Salmonella sp.*, *E. coli sp.*, *Listeria sp.*, *Clostridium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Campylobacter sp.*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*...; es decir, orina, sangre, suero, heces, líquido cerebral. Tales bacterias están normalmente ausentes en los alimentos seguros o en las personas sanas.

Más específicamente, la presente invención define que dicho antígeno puede elegirse del grupo que comprende proteína C reactiva (PCR), troponina, mioglobina, GCH (gonadotropina coriónica humana), HL (hormona luteinizante), factores reumatoides, cardiolipina, centrómero (proteínas cinetocóricas), histonas, Jo-1 (nombrado de manera epónima, igual que la histidil ARNt transferasa), coagulante lúpico, mieloperoxidasa, autoantígenos nucleolares, cada PM-Scl = polimiositis-Esclerodermia, RNP (ribonucleoproteínas) (ejemplo U1RNP), Scl70 (igual que la topoisomerasa 1), Sm (nombrado de manera epónima como antígeno Smith, igual que el antígeno nuclear), SSA/Ro (antígeno del síndrome de Sjögren), SSB/La (antígeno del síndrome de Sjögren), tiroglobulina, lipoproteínas de la superficie celular, autoantígenos tiroideos, colágeno, ANCA (anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo) (reivindicación 29). La PCR aumenta en caso de infecciones, la mioglobina en estados de traumatismo, la troponina en caso de infarto de miocardio, los factores reumatoides en caso de estados inflamatorios y la GCH en caso de embarazo. Adicionalmente, dicha proteína puede elegirse del grupo que comprende un receptor adrenérgico beta, receptor de TSH, receptor de insulina, receptor de acetilcolina, receptor de gastrina, piruvato deshidrogenasa. No obstante, este dispositivo de ensayos puede usarse para la detección de muchas otras sustancias y no se limita a los ejemplos enumerados.

El dispositivo de ensayo de la invención también puede usarse para detectar una enzima uniendo un compuesto que tiene una alta afinidad por esta enzima al elemento poroso como el receptor de ensayo. Este compuesto podría ser el sustrato de la enzima o cualquier otra proteína o molécula que se une específicamente a esta enzima. Puede usarse un anticuerpo marcado frente a la enzima para detectar la formación de un complejo receptor-enzima en el elemento poroso. Tal como conoce el experto en la técnica también pueden usarse otros compuestos que tienen una capacidad de unión específica hacia esta enzima.

Estas proteínas pueden reconocerse por compuestos de unión a analito tales como anticuerpos. Los controles positivos contienen preferentemente proteínas purificadas de fuentes naturales; sin embargo, pueden usarse proteínas recombinantes con un plegamiento similar al que se encuentra en la proteína natural. Por consiguiente, el compuesto de unión a analito necesita reconocer preferentemente un analito con una conformación tal como se encuentra en la proteína natural; sin embargo, también pueden usarse compuestos de unión a analito que reconocen tanto una proteína plegada correctamente como una proteína desnaturalizada.

Según la presente invención, el analito podría comprender un anticuerpo que pertenece a cualquier clase de inmunoglobulinas tales como IgE, IgG, IgM, IgA, IgD. La presencia de un anticuerpo específico en una muestra podría dar indicaciones sobre la fase, la ubicación y la naturaleza de una enfermedad. Un aumento de la IgE es una medida para las reacciones alérgicas y la presencia de parásitos helmínticos; el aumento de IgG confirma la presencia de infecciones que ya están en una fase extendida; la IgM indica que las infecciones están presentes en un estado temprano. La IgA puede detectarse especialmente en secreciones y las IgD están presentes en las membranas de las células B. La presente invención ilustra la detección del anticuerpo anti-mitocondrial de tipo M2 y anticuerpos frente a factores reumatoides mediante el método de FT de la presente invención. Sin embargo, el método de FT de la presente invención puede usarse para detectar otros anticuerpos, incluso para detectar anticuerpos de una clase de Ig diferente o anticuerpos que están presentes en las superficies celulares. Los ejemplos y las leyendas de las figuras sirven para ilustrar la invención y no han de entenderse en modo alguno como limitativos de la presente invención.

El dispositivo de ensayo de esta invención también puede usarse en ensayos para un anticuerpo que emplea un antígeno como primer compuesto de unión a analito en la fase sólida y que usa un antígeno marcado o anti-anticuerpo marcado como el segundo compuesto de unión a analito. Este último es particularmente adecuado para ensayos específicos de alergia en los que el primer compuesto de unión a analito es un alérgeno unido al elemento poroso y el segundo compuesto de unión a analito es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal frente a IgE. En otros casos, la respuesta de IgG a alérgenos puede medirse de manera similar, es decir, usando un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal frente a IgG, como el segundo compuesto de unión a analito. Otras pruebas de anticuerpo que pueden llevarse a cabo de esta manera incluyen pruebas para la detección de infecciones virales, por ejemplo herpes, rubéola, hepatitis, citomegalovirus, rotavirus, VSR, VLTH-III, VIH o infecciones bacterianas, por ejemplo *Streptococcus A&B*, *Chlamydia*, *M. tuberculosis*, *M. pneumoniae*, *H. pylori*, *Clostridium*, *E. coli*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*.

Adicionalmente, la presente invención define que dicho oligómero de ácido nucleico puede elegirse del grupo que comprende ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN o análogos químicos de los mismos, modificados genéticamente o no. Con moléculas de ADN o ARN se hace referencia a ADN complementario (ADNc), ADN genómico (ADNg), ADN bicatenario (ANDbc), ADN monocatenario (ADNmc), ARN nuclear (ARNn), ARN de transferencia (ARNt), ARN

mensajero (ARNm) y ARN ribosómico (ARNr). Las moléculas de ARN también pueden incluir ARNbc. Cuando se usan oligómeros de ácido nucleico que no se aíslan de cualquier organismo vivo, también pueden usarse moléculas híbridas de ARN/ADN u oligómeros que consisten en nucleótidos no naturales tales como inosinas. En estos casos, el elemento poroso puede recubrirse con un oligómero de ácido nucleico como un primer compuesto de unión a analito para la detección de material de ácido nucleico en una muestra. El primer compuesto de unión a analito puede ser un oligómero de ADN, por ejemplo, complementario a una secuencia en el ácido nucleico de interés y puede usarse para unirse o bien a ARN o bien a ADN. Posteriormente, la detección del complejo formado puede realizarse usando un segundo oligómero de ácido nucleico complementario a una región que no interfiere del ligando de ácido nucleico de interés, estando marcado el segundo oligómero para permitir la detección.

Según la presente invención, el marcador enzimático, que está acoplado a dicho segundo compuesto de unión a analito o dicha molécula de detección, reacciona en una etapa con un sustrato precipitante y puede elegirse del grupo que comprende peroxidasa del rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (FA) y deshidrogenasa. La deshidrogenasa puede especificarse que es, por ejemplo, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa o una malato deshidrogenasa. Para las enzimas glucosa oxidasa, colesterol oxidasa, ureasa, β -galactosidasa, y lisozima no se han identificado sustratos precipitantes hasta el momento. No obstante, el principio para usar éstos en el mismo contexto es similar al descrito para los sustratos mencionados anteriormente.

En la presente invención, dicho marcador enzimático está unido covalente o no covalentemente al segundo compuesto de unión a analito. Para el enlace, el segundo compuesto de unión a analito debe tener un grupo reactivo que sea complementario a un grupo reactivo en el marcador enzimático. Por ejemplo, un grupo carboxilo libre de la segunda proteína de unión a analito se complementa con el extremo amino-terminal de un marcador enzimático de tal modo que puede producirse un enlace amida. Alternativamente, el compuesto de unión a analito debe poder modificarse para tener un grupo reactivo que se complementa con un grupo reactivo del marcador enzimático. El segundo compuesto de unión a analito pueden unirse al resto de enlace directamente o por medio de un resto separador. Los expertos en la técnica reconocerán que, mientras que en la mayoría de los casos el compuesto de unión a analito y el marcador enzimático se unirán directamente, en algunos casos puede ser deseable separar el resto de unión de cualquiera o ambas partes con un resto espaciador. Se reconocerá que puede emplearse prácticamente cualquier enlace que sea estable en las condiciones de uso y que pueda formarse fácilmente sin desnaturalizar o degradar de otra manera el compuesto de unión a analito y/o marcador enzimático. Por tanto, puede utilizarse el compuesto de unión a analito y el marcador enzimático que pueden incluir prácticamente cualquier grupo reactivo que sea complementario a, es decir que pueda reaccionar covalentemente con, el extremo terminal respectivo del resto de unión al que se unirá. Los grupos adecuados complementarios al extremo amino-terminal del resto de unión incluyen, por ejemplo, grupos carboxilo, ésteres que incluyen ésteres activados tales como ésteres de NHS, azidas de acilo, haluros de acilo, nitrilos de acilo, aldehídos, haluros de alquilsulfonilo, halotriazinas, imidoésteres, isocianatos, isotiocianatos, ésteres de sulfonato, etc. Los grupos reactivos adecuados complementarios al extremo carboxilo-terminal del resto de unión incluyen, por ejemplo, aminas, alcoholes, haluros de alquilo, tioles, hidracinas, diazoalcanos, ésteres de sulfonato, etc. Se conocen bien las condiciones para formar enlaces covalentes entre una gran cantidad de pares de grupos reactivos complementarios. Preferiblemente, cada enlace entre el resto de unión y el agente biológicamente activo y el resto de enmascaramiento es una amida. Se conocen bien las condiciones para unir moléculas entre sí que tienen grupos amino y carboxilo complementarios para formar enlaces de amida (véase, por ejemplo, Merrifield 1997 Merrifield, B. 1997. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* 289: 3-13.). Los ejemplos de enlaces no covalente ya se ilustraron anteriormente.

Según una realización preferida de la presente invención, dicho sustrato de HRP puede elegirse del grupo que comprende TMB (tetrametilbencidina) y AEC (3-amino-9-etilcarbazol). Cuando se usa la peroxidasa del rábano, la reacción enzimática consiste en la reacción de 3-3',5-5'-tetrametilbencidina con la enzima y la hidrógeno peroxidasa formando en una etapa un producto de oxidación de 1 electrón de catión radical libre azul insoluble.

Los sustratos mencionados están disponibles comercialmente. Sin embargo, los inventores ilustran en la presente invención que la fuente de la disolución de TMB puede ejercer una influencia en la calidad de los resultados obtenidos. También otros reactivos conocidos en la técnica pueden formar sustratos adecuados. El AEC produce un producto final rojo que es soluble en alcohol. Este sustrato que puede precipitar se usa principalmente en las técnicas de tinción inmunohistoquímicas y de inmunotransferencia, véase histología.

Según una realización preferida de la presente invención para la fosfatasa alcalina dicho sustrato puede elegirse del grupo que comprende BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo) y BCIP-NBT (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo-azul de nitrotetrazolio). Los sustratos mencionados están disponibles comercialmente. También son adecuados otros reactivos conocidos en la técnica. Cuando el BCIP reacciona con fosfatasa alcalina, se dimeriza el derivado de indoxilo halogenado libre, formando un colorante de índigo insoluble. Este producto se usa comúnmente para técnicas de tinción inmunohistoquímicas y de inmunotransferencia, véase histología. El sistema BCIP-NBT se basa en la hidrólisis del BCIP y la reducción del NBT produciendo un producto de reacción púrpura oscuro. Este reactivo puede usarse para técnicas de tinción inmunohistoquímica, de inmunotransferencia y en técnicas de hibridación *in situ*.

Para una deshidrogenasa, el sustrato que ha de usarse según la presente invención puede ser NBT (azul de nitrotetrazolio). También se usa azul de nitrotetrazolio en los sistemas de detección de analitos que emplean la actividad deshidrogenasa. El sustrato mencionado está disponible comercialmente. También pueden usarse otros sustratos que pueden precipitar conocidos en la técnica.

ES 2 295 227 T3

Posteriormente a la formación de la precipitación, el precipitado de TMB puede fijarse usando un reactivo que comprende poli(alcohol vínflico) complementado con sulfosuccinato de dioctilo y dimetilformamida. Tal disolución detiene la reacción enzimática y permite el registro permanente del resultado.

5 El dispositivo de ensayo según la presente invención puede usarse para una respuesta cualitativa (respuesta sí/no); semicuantitativa (-/+/++/+++ /++++) o cuantitativa. En una realización preferida de la invención, el dispositivo de ensayo contiene al menos 1 zona de prueba que puede usarse para (un) patrón/patrones y/o (un) control(es) positivo(s) y/o negativo(s) y/o de punto de corte. Con patrón se hace referencia a un calibrador. Como calibradores, podría usarse un conjunto de al menos una disolución de analito con concentración conocida. Esto ayuda a evaluar la concentración de
10 analito en una muestra de manera cuantitativa o semicuantitativa. El uso de un control de acumulación positivo muestra si la prueba funciona. El uso de un punto de corte de acumulación puede usarse para la interpretación cualitativa del control de los resultados (respuesta sí/no) pero no puede recuperarse de él información cuantitativa. Para pruebas específicas, puede ser recomendable que más de una zona de prueba esté presente en el dispositivo de ensayo de la invención. Por ejemplo cuando se usa para someter a prueba una alergia, puede desarrollarse 1 tarjeta con 6 orificios
15 para cada panel de alérgenos. Alternativamente, para someter a prueba los marcadores cardiacos, por ejemplo tropoina, mioglobina, sería óptima una tarjeta en la que se someten a prueba al mismo tiempo los diversos marcadores cardiacos. Dicha(s) zona(s) de prueba(s) puede(n) ubicarse dentro del mismo orificio de la capa de cubierta superior en orificios separados.

20 La presente invención también se refiere a la interpretación de la señal observada usando un sistema de tarjetas o usando un lector. Un "sistema de tarjetas" puede definirse como un soporte en el que están indicadas manchas coloreadas de diferentes intensidades de color. Cuando la prueba es reproducible, el color visualizado puede relacionarse con una concentración del analito en la muestra sometida a prueba. Este soporte podría comprender orificios dentro de estas manchas de color. De esta manera, el color del soporte puede compararse fácilmente con el color formado en el
25 dispositivo de ensayo superponiendo ambos dispositivos. Alternativamente, puede usarse un lector que mide la reflectancia para monitorizar los depósitos de color. Puede usarse cualquier lector que mida la reflectancia conocido por el experto en la técnica. En los ejemplos se usa el VISI-CHROMA™ VC-100 de Biophotonics S.A. (Lessines, Bélgica); sin embargo, pueden usarse otros sistemas tales como lectores de reflectancia, por ejemplo lectores Nycomed.

30 El lector VISI-CHROMA que se usa por los inventores para la interpretación de los resultados usa una cámara CCD de color (dispositivo acoplado a la carga) permitiendo una medición precisa de una manera triestímulo (3 filtros) en un área seleccionada de la membrana. Tal técnica permite una medición muy precisa del depósito coloreado (punto).

35 El presente dispositivo de ensayo puede usarse para controlar/someter a prueba/determinar muestras de alimentos. Puede determinarse la presencia de bacterias, virus, micotoxinas, toxinas, residuos de pesticidas, residuos de antibióticos, residuos de sustancias químicas. Ejemplos de bacterias son *Salmonella sp.*, *E. coli sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Campylobacter sp.*, *Listeria sp.*, *Streptococcus sp.*

40 La presente invención ilustra la detección de *Salmonella* mediante el método de FT de la presente invención. Sin embargo, el método de FT de la presente invención puede aplicarse para detectar otro ADN/ARN que comprende agentes biológicos, tales como virus, micobacterias, todos los tipos de células procariontas y eucariontas. Los ejemplos y las leyendas de las figuras sirven para ilustrar la invención y no han de entenderse en modo alguno como limitativos de la presente invención.

45 Ejemplos de toxinas son endo o exotoxinas, termoestables o termolábiles. Ejemplos de micotoxinas son aflatoxinas de tipo A&B, ocratoxina. Ejemplos de residuos de pesticidas son PCB, ditiocarbamatos, propamocarb, bencimidazoles, organocloruros. Ejemplos de residuos de antibióticos son residuos de beta-lactamas, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas, aminoglucósidos pero también antibióticos que se usan como promotores del crecimiento animal tales como bacitracina, tilosina, espiramicina, virginiamicina y avoparcina. Para fines medioambientales
50 pueden controlarse/someterse a prueba/determinarse antígenos similares.

55 El presente método puede aplicarse para el diagnóstico y/o la monitorización del tratamiento de enfermedades. Ejemplos son la detección de infecciones virales (familias de virus: adenoviridae, coronaviridae, papovaviridae, reovoviridae, etc.), infecciones bacterianas (especies de *Yersinia*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Helicobacter (H. pylori)*, etc.) y el diagnóstico de proteínas de fase aguda (factores reumatoides, PCR, amiloide A en suero, etc.). Ejemplos importantes de infección viral son las infecciones por VIH (virus de inmunodeficiencia humana) que provoca el SIDA y VHC (virus de la hepatitis C) que da como resultado cirrosis e insuficiencia hepática.

60 Por ejemplo, según la presente invención, el método puede aplicarse para el diagnóstico y/o la monitorización del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias inducidas por autoantígenos específicos de órgano o no específicos de órgano. La tabla 1 resume los principales anticuerpos específicos y no específicos de órgano. Las tablas 2 y 3 enumeran autoantígenos específicos y no específicos de órgano. Los autoantígenos no específicos de órgano inducen generalmente una respuesta autoinmunitaria mediante la cual están implicados diferentes órganos.

65 Dicha enfermedad autoinmunitaria no específica de órgano (multisistémica) puede elegirse del grupo de enfermedades que comprende lupus eritematoso sistémico (LES) y otras enfermedades reumáticas, esclerodermia con o sin síndrome de Crest, lupus eritematoso (LE) inducido por fármacos, polimiositis con o sin esclerodermia, síndrome de Sjögren primario, artritis reumatoide y otras enfermedades del tejido conjuntivo (véase la tabla 2).

Los antígenos específicos de órgano inducen en primer lugar enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano. En tal caso, las manifestaciones clínicas originalmente sólo afectan a un órgano, por ejemplo el hígado en el caso de la cirrosis biliar primaria, pero la aparición de la enfermedad también puede afectar a otros órganos.

5 Dicha enfermedad autoinmunitaria específica de órgano puede elegirse del grupo de enfermedades que comprende la enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis activa crónica, celiaquía, síndrome de Good-pasture, tirotoxicosis de Graves, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, diabetes de aparición juvenil, diabetes de aparición tardía, uveítis inducida por el cristalino, cierta esterilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia grave, penfigoide, cirrosis biliar primaria, anemia perniciosa, mixedema primario, oftalmia simpática, colitis
10 ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener (véase la tabla 3) (Lemoine 1992; Humbel; Abuaf *et al.*).

Según la presente invención, el método puede aplicarse para el diagnóstico y/o la monitorización del tratamiento de enfermedades infecciosas incluidas por virus, bacteria, mohos, micobacterias o parásitos. Ejemplos de antígenos que pueden detectarse en caso de enfermedades infecciosas son de VIH, HbsAg, HbsAb, HbeAg, HbeAb, HbclgM,
15 malaria, *Chlamydia*, *StrepA*, *H. pylori*, enfermedad de Lyme, *Salmonella*, *E. coli*, sífilis, TB, dengue y chagas.

Según la presente invención, el método puede aplicarse para el diagnóstico y/o la monitorización del tratamiento de enfermedades alérgicas o manifestaciones de intolerancia inducidas por numerosos alérgenos de hierbas, malas hierbas, mohos, alimentos, árboles, materias epidérmicas y polvo. Se han identificado más de 2000 posibles alérgenos.
20 Ejemplos de los alérgenos mencionados anteriormente son: cerrillo, festuca roja, polen de avena cultivada; ambrosía común, ambrosía del oeste, diente de león, *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, clara de huevo de pollo, leche de vaca, cangrejo, yema de huevo; madera de arce, aliso, abedul, avellana, roble; epitelio de gato y perro, producto de descamación de caballo y vaca; polvo de Greer o Bencard.

25 Según la presente invención, el método puede aplicarse para su uso en las pruebas de marcadores cardíacos. Dichos marcadores cardíacos pueden elegirse del grupo que comprende mioglobina, creatina cinasa y troponina. Dichos marcadores inflamatorios pueden elegirse del grupo que comprende proteína C reactiva y

Según la presente invención, el método puede aplicarse para su uso en las pruebas de bacterias y/o toxinas. Con
30 “pruebas” se hace referencia a detectar la presencia/ausencia, el aumento o la disminución de ciertos antígenos. Las toxinas pueden incluir micotoxinas. Ejemplos de bacterias que van a detectarse son *Salmonella sp.*, *E. coli sp.*, *Listeria sp.*, *Clostridium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Campylobacter sp.*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Shigella sp.*, *Bacillus sp.*

La presente invención también se refiere a un método, según la invención, para su uso en pruebas de antígenos de
35 tumor. Ejemplos de antígenos que pueden detectarse en caso de tumores son AFP, PSA, CEA, CA-15-3 y ferritina.

Ejemplos de antígenos que pueden detectarse, usando el método en caso de toxicomanía son metanfetamina, barbitúricos, benzodiacepina, anfetamina, morfina, THC, cocaína y perfil.

40 Generalmente, la presente invención también implica un método para la detección de un analito presente en una muestra de prueba.

Dicho método puede comprender etapas en las que la adición del primer compuesto de unión a analito, muestra, segundo compuesto de unión a analito, disolución de sustrato y disolución de fijación se realizan posteriormente, uno
45 tras otro. De manera interesante, no es necesaria ninguna etapa de lavado tras la adición del sustrato. La omisión de la etapa de lavado se debe al proceso de bloqueo específico de la membrana tras el recubrimiento de la proteína de unión sobre la membrana que bloque cualquier sitio libre restante.

Alternativamente, dicho método puede comprender etapas en las que la adición del primer compuesto de unión
50 a analito, muestra, segundo compuesto de unión a analito, disolución de sustrato y disolución de fijación no se realizan todas posteriormente, algunos de éstos pueden mezclarse previamente por adelantado antes de ponerlos en el dispositivo. Lo anterior ha forzado a la solicitud de la invención hacia ensayos inmunométricos secuenciales con los anticuerpos monoclonales, es decir, un inmunoensayo que usa un primer receptor de anticuerpo monoclonal sobre el elemento poroso y un segundo receptor de anticuerpo monoclonal que está marcado. Se añade la muestra al elemento
55 poroso seguido por el anticuerpo marcado. Son posibles otras variantes del ensayo. Por ejemplo, en el caso de un ensayo inmunométrico, el anticuerpo marcado y la muestra pueden mezclarse antes de la adición al elemento poroso. En otra realización de la invención, el dispositivo de ensayo se usa para realizar ensayos competitivos, es decir, ensayos en los que el primer compuesto de unión a analito está unido al elemento poroso y por el que compete el analito en la muestra con una cantidad fijada de analito marcado añadido a la disolución de muestra o añadido tras la adición de
60 la muestra. Los inmunoensayos competitivos se ejecutan convenientemente de este modo usando un anticuerpo, por ejemplo, una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal como primer compuesto de unión a analito unido a la fase sólida. El antígeno marcado puede añadirse a la muestra antes de añadir la muestra a la capa porosa. Alternativamente, puede añadirse tras la adición de la muestra o simultáneamente a la misma. Cuando se usa una molécula de captura, la muestra puede someterse a ensayo de una variedad de maneras. Por ejemplo, en un “ensayo de tipo
65 intercalado”, un primer compuesto de unión a analito y un segundo compuesto de unión a analito marcado pueden combinarse con la muestra para unirse al analito antes de la adición al elemento poroso. Alternativamente, un primer compuesto de unión a analito y una muestra pueden combinarse antes de la adición al elemento poroso, o añadirse en la secuencia de, en primer lugar, un compuesto de unión a analito y después la muestra, para ir seguido por la adición

ES 2 295 227 T3

de un segundo compuesto de unión a analito marcado. En tales ensayos de tipo intercalado, la molécula de captura se selecciona para unirse al primer compuesto de unión a analito y no al segundo compuesto de unión a analito marcado. En un formato de ensayo competitivo, la intensidad de la coloración del depósito es inversamente proporcional a la concentración del marcador que va a detectarse.

5

La presente invención también describe un método para recubrir la capa porosa intermedia del dispositivo de la presente invención que comprende las siguientes etapas:

10

- cortar membranas en tiras
- sumergir dichas tiras en un tampón de aplicación y el agente de captura o primer compuesto de unión a analito,
- incubar la membrana,
- sumergir la membrana en un agente de bloqueo que contiene del 0,2 al 10% de agente de bloqueo, mediante lo cual el agente de bloqueo puede ser BSA o cualquier otro agente conocido para bloquear los sitios libres sobre las membranas,
- incubar las membranas,
- secar las tiras, y,
- cuando sea necesario almacenamiento, las tiras se empaquetan con el fin de proteger las membranas de la humedad. Esto se realiza preferentemente mediante la aplicación de vacío. Se realiza un almacenamiento posterior,

15

20

25

30

en el que el tampón de recubrimiento (aplicación) presenta preferentemente una salinidad muy baja y un pH básico (9,1 +/- 0,1) y el compuesto de unión a analito está presente en exceso. La estructura de la proteína de unión puede requerir otros tipos de tampón de aplicación.

Según una realización preferida de la presente invención, la capa porosa intermedia del dispositivo según la invención se recubre comprendiendo las siguientes etapas:

35

40

45

50

en el que el tampón de recubrimiento (aplicación) presenta preferentemente una salinidad muy baja y un pH básico (9,1 +/- 0,1), y el compuesto de unión a analito está presente en exceso. Todos los parámetros descritos en este caso podrían variarse usando condiciones para el analito que va a detectarse mediante el dispositivo de ensayo de flujo a través.

55

Preferentemente, el método de flujo a través que usa un dispositivo tal como se describe por la invención se realiza usando las siguientes etapas:

60

65

- diluir la muestra de 1/2 a 1/100.000 en el tampón diluyente, siendo el tampón diluyente un tampón Tris de baja salinidad y que contiene del 1 al 5% de BSA. La composición del diluyente puede adaptarse al analito que va a detectarse. Alternativamente, puede usarse una muestra sin diluir.
- aplicar 15 μ l o una gota de muestra diluida sobre la membrana,
- permitir que la muestra se absorba durante 1 minuto al menos, es decir en el intervalo desde 30" hasta 1'30" preferentemente 45". El primer tiempo de absorción depende de la muestra que va a someterse a prueba, por ejemplo una muestra que contiene un alto nivel de leucocitos o fibrina puede absorberse más lentamente,

ES 2 295 227 T3

- aplicar 25 μ l o una gota de conjugado, es decir anticuerpo anti-PCR acoplado a HRP y permitir que se absorba,
- 5 - aplicar 25 μ l o una gota de TMB precipitante y permitir que se absorba,
- aplicar 25 μ l o una gota de disolución de fijación y permitir que se absorba,
- esperar durante 2 minutos antes de leer el resultado y leer en el plazo de 30 minutos, y,
- 10 - cubrir la mancha coloreada con una cinta Scotch, es decir de tipo 3M, cuando pueda ser necesario un almacenamiento a largo plazo del resultado.

Tal como se describe en la sección de ejemplos, la presente invención (ejemplo 1) también describe un método optimizado para detectar analitos por medio de inmunotransferencia de punto basándose en un ensayo enzimático tal como se describió previamente para el concepto de flujo a través. En este procedimiento, el recubrimiento de una tira de capa porosa con un primer compuesto de unión a analito o con una molécula de captura comprende las siguientes etapas:

- 20 - enjuagar las tiras de membrana en alcohol durante de 1 a 60 segundos,
- incubar la membranas en un tampón salino frío entre 1 y 60 minutos,
- añadir de 0,1 a 10 μ l de disoluciones de recubrimiento,
- 25 - incubar las tiras durante de 1 hora a durante la noche entre 4 y 25°C con agitación,
- secar las membranas durante de 1 hora a durante la noche a temperatura ambiente
- saturar las membranas con una proteína de bloqueo durante de 15 min a durante la noche a TA o 4°C,
- 30 - respectivamente, con agitación, y,
- secar las membranas a 37°C durante la noche o durante el fin de semana.

Estas tiras pueden usarse posteriormente en una inmunotransferencia de punto o en cualquier procedimiento de ensayo equivalente. El procedimiento de punto puede realizarse comprendiendo las siguientes etapas:

- 35 1. diluir las muestras que contienen analito 1/2 ó 1/10.000 en el tampón diluyente Tris,
- 40 2. incubar de 1 a 2 ml de esta muestra diluida durante de 5' a 45' (tiempo X) a temperatura ambiente (TA) con agitación,
3. lavar las membranas al menos tres veces con de 1 a 3 ml de disolución de Tris (0,01 M) y Tween 20 (del 0,5% al 1%) durante al menos 3' en cada caso con agitación,
- 45 4. añadir de 1 ml a 2 ml de conjugado marcado enzimáticamente para lo cual el factor de dilución se adapta según el método,
5. incubar la membrana durante al menos de 5 a 30 minutos a TA (tiempo Y) con agitación,
- 50 6. lavar las membranas tres veces durante al menos 3' en cada caso con agitación,
7. añadir de 1 a 2 ml de disolución de cromógeno (sustrato precipitante de membrana),
8. incubar la membrana durante de 1' a 15' (tiempo Z) a TA con agitación,
- 55 9. detener la reacción mediante la adición de 1 ml de disolución de detención,
10. analizar el aspecto de una mancha azul de intensidad variable.

60 Todos los parámetros descritos en este caso podrían variarse usando las condiciones descritas para el dispositivo de ensayo de flujo a través desarrollado anteriormente.

Los siguientes ejemplos y leyendas de figuras sirven meramente para ilustrar la invención y no han de entenderse en modo alguno como limitativos de la presente invención.

65

Breve descripción de las figuras

5	Tabla 1:	Principales anticuerpos específicos y no específicos de órgano presentes en enfermedades autoinmunitarias.
	Tabla 2:	Antígenos no específicos de órgano.
	Tabla 3:	Antígenos específicos de órgano.
10	Tabla 4 (4a-4c):	Evaluación del método de flujo a través descrito en la presente invención y otros métodos existentes de inmunoturbidimetría y método de flujo a través de Nycomed.
	Tabla 5:	Evaluación de diferentes lotes de membrana.
15	Tabla 6:	Pruebas de diferentes lotes de membranas.
	Tabla 7 (7a-7h):	Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo.
	Tabla 8 (8a-8f):	Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos.
20	Tabla 9 (9a-9c):	Evaluación de diferentes agentes de TMB.
	Tabla 10 (10a-10c):	Evaluación de la menor detección que puede detectarse.
25	Tabla 11 (11a-11b):	Detección de anticuerpos anti-mitocondriales de tipo M2.
	Tabla 12:	Detección de <i>Salmonella typhimurium</i> .
	Tabla 13:	Influencia de la composición del tampón diluyente.
30	Tabla 14 (14a-14e):	Correlación con otro método rápido para la detección de PCR mediante inmunoturbidimetría.

Modos para llevar a cabo la invención

35 Los inventores desarrollaron una prueba rápida basada en membranas para la detección de analito(s). La prueba descrita se ha desarrollado y optimizado por primera vez para la detección de la proteína C reactiva (PCR) que es una proteína de fase aguda (ejemplos 1-4, 8, 9, 16). Tal como demostraron los inventores en la presente invención, esta prueba puede usarse para detectar cualquier otro analito en cualquier otro medio.

40 También se han realizado otros ensayos para la detección de factores reumatoides (ejemplo 6), anticuerpos M2 (ejemplo 5) o *Salmonella typhimurium* (ejemplo 7).

45 En el experimento 1 se estudió la presencia del analito PCR usando un anticuerpo anti-PCR de antisuero policlonal (de origen de conejo) a una concentración final de 10 µg/ml como anticuerpo de captura durante el procedimiento de recubrimiento.

50 En el ejemplo 5 se estudió la presencia de anticuerpos anti-M2; se recubrió una piruvato deshidrogenasa de auto-antígeno específico de órgano purificada (antígeno PDH = antígeno M2) con una actividad enzimática de 0,0634 unidades/ml.

55 En el ejemplo 6 se analizó la presencia de factores reumatoides usando inmunoglobulinas humanas purificadas como anticuerpo de captura durante el procedimiento de recubrimiento; se aplicó una disolución de inmunoglobulinas humanas purificadas con una concentración de recubrimiento de 48 µg/ml.

En el ejemplo 7 se estudió la presencia de *Salmonella typhimurium* usando un anticuerpo monoclonal como proteína de captura durante el procedimiento de recubrimiento a una concentración final de 0,1 mg/ml.

60 Los niveles en suero o plasma de PCR aumentan en respuesta a procesos inflamatorios infecciosos y no infecciosos. Los niveles pueden aumentar desde +/- 5 mg/l hasta 500 mg/l. Las mediciones del nivel de PCR son útiles para distinguir un aumento viral, es decir ligero de hasta 50 mg/l de infecciones bacterianas graves, es decir hasta 500 mg/l y para comprobar la eficacia del tratamiento. La detección de niveles bajos de PCR que oscilan desde 1 mg/l hasta 5 mg/l puede predecir la aterosclerosis.

65 Pueden usarse diversos métodos para la detección de PCR, tales como radioinmunoanálisis (RIA), inmunodifusión radial, aglutinación de látex, turbidimetría, nefelometría, inmunoensayo enzimático, por ejemplo ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, polarimetría de fluorescencia e inmunoensayos basados en membrana. Los métodos de

ES 2 295 227 T3

inmunodifusión radial o aglutinación de látex sólo permiten una interpretación de sí o no o semicuantitativa. Estos métodos en general presentan una falta de sensibilidad o falta de precisión. Otros métodos mencionados anteriormente son pruebas basadas en instrumentos que permiten una interpretación cuantitativa de los resultados. Sin embargo, para tales métodos, el tiempo requerido para obtener los resultados es generalmente demasiado largo y con frecuencia el procedimiento requiere varias etapas de lavado.

Por tanto, se necesitan nuevos sistemas de prueba rápida fiables para el diagnóstico especialmente de enfermedades inflamatorias.

10 Ejemplo 1

Optimización de un método de punto como prueba rápida

El objetivo de este estudio de viabilidad fue desarrollar un método rápido que permita la interpretación de los resultados en el plazo de algunos minutos sin ningún instrumento de laboratorio sofisticado.

1.1 *Fabricación de tiras de puntos*

Se utilizaron membranas de poli(fluoruro de vinilideno) de Millipore (cat. 00010 IPVH) con un diámetro de poro de 0,45 μm y se cortaron en tiras de 3 mm de ancho. Las tiras se enjuagaron con etanol absoluto (Merck 1.00.983) durante 15 segundos y se incubaron en TBS fría (solución salina tamponada con Tris, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 9,0+/-0,1) durante 10 minutos antes de comenzar el procedimiento de recubrimiento (aplicación). Los volúmenes de recubrimiento son pequeños, es decir, de 1 a 5 μl y se requieren pipetas precisas o un dispositivo de manchado preciso, por ejemplo el sistema BIO dot. En este experimento se utilizó una pipeta precisa para este fin. Tras el recubrimiento usando un "procedimiento de manchado", las membranas se secaron a 37°C seguido por una etapa de saturación usando una proteína de bloqueo cuya concentración oscilaba desde el 1% hasta el 5%. En este experimento se usó BSA. Esta etapa de bloqueo se llevó a cabo durante 1 hora a TA con agitación. Las membranas se secaron posteriormente durante la noche a 37°C.

Se realizaron tres experimentos usando estas tiras recubiertas mediante los cuales, para cada experimento, se buscó un analito diferente y/o se utilizó un anticuerpo diferente.

1.2 *Procedimiento de punto*

Según el analito que vaya a detectarse, los procedimientos de punto se llevaron a cabo de la siguiente forma:

1. Las muestras que contenían proteína PCR (experimento 1) o factores reumatoides tipo IgM (experimento 2) en anticuerpos anti-M2 (experimento 3) se diluyeron de 1/50 a 1/100 en tampón diluyente Tris.
2. Se incubaron de 1 a 2 ml de esta muestra diluida durante de 5' a 45' (tiempo X) a temperatura ambiente (TA) con agitación.
3. Se lavaron las membranas tres veces usando de 1 a 3 ml de disolución de Tris (0,01 M) y Tween 20 (del 0,5% al 1%) durante 3' cada una, con agitación.
4. Se usaron de 1 ml a 2 ml de conjugado para la incubación adicional.
5. Se llevó a cabo la incubación durante de 5 a 30 minutos a TA (tiempo Y) con agitación.
6. Se lavaron las membranas por segunda vez tres veces durante 3' cada una con agitación (véase la etapa 3).
7. Se añadieron de 1 a 2 ml de disolución de cromógeno, es decir, TMB precipitante de membrana.
8. Se llevó a cabo la incubación durante de 1' a 15' (tiempo Z) a TA con agitación.
9. Se detuvo la reacción mediante la adición de 1 ml de disolución de detección o fijación.
10. Se analizó visualmente la aparición de una mancha azul de intensidad variable.

La especificidad del conjugado se eligió según el analito que iba a detectarse. En el experimento 1 se usó anticuerpo anti-PCR marcado con HRP a la concentración de 0,65 g/l; en el experimento 2 se usó anticuerpo humano anti-IgM de cadena μ (P0322 de Dako, Fab'2) a la concentración de 1 g/l; en el experimento 3: se usó una mezcla de anticuerpo humano anti-IgG de cadena gamma (P406 de Dako, Fab'2) y anticuerpo humano anti-IgM de cadena μ (P 322 de Dako, Fab'2) a una concentración final de 1 g/l.

ES 2 295 227 T3

Para los tres experimentos, la composición de la disolución de fijación fue de la siguiente forma (para 100 ml):

5	0,1 g de sulfosuccinato de dioctilo	SIGMA	D0887
	0,5 ml de dimetilformamida	”	D8654
	1,9 ml de poli(alcohol vínlico) al 5%	”	P8136
	76 ml de H ₂ O (filtrada)		

10 1.3 Interpretación de los resultados

La formación de color se evaluó cualitativamente. Cuando se formó un color se interpretó que la muestra era positiva, lo que significa que la muestra de prueba contenía el analito.

15 1.4 Conclusión final

20 El TMB precipitante permitió el desarrollo de una coloración azul proporcional a la concentración de PCR. La presencia de reactivos de solubilización en el tampón diluyente pareció evitar la interferencia debida a otras proteínas de la sangre, tales como la albúmina humana y las inmunoglobulinas. El procedimiento de recubrimiento y el procedimiento de bloqueo se optimizaron disminuyendo el ruido de fondo. El uso de nuevas tiras de puntos permitió buenos resultados con tiempos de incubación de 5'5'1' usando el sistema HRP-TMB de detección enzimática. No obstante, las etapas de lavado todavía son engorrosas y las inmersiones simples, que excluyen el uso de cualquier etapa de lavado y la disminución de los tiempos de incubación de 2'2'1', indujeron un ruido de fondo demasiado alto.

25 Además, con un método de este tipo, se requiere una agitación suave con el fin de optimizar la interacción inmunológica (Ag-Ac). Además, las etapas de lavado son obligatorias con el fin de separar la fracción libre de la fracción unida. Además, este procedimiento de lavado puede realizarse con agitación con el fin de evitar ruidos de fondo tales como la coloración de fondo azul de las tiras.

30 Finalmente, este método requiere cierto equipo de laboratorio, por ejemplo agitador basculante y algunas etapas del procedimiento son engorrosas, por ejemplo el procedimiento de lavado. Además, pueden usarse grandes volúmenes de reactivos, es decir 1 ml o más, lo que no cumple con los requisitos de volumen para las pruebas rápidas (véase la introducción).

35 Debido a los argumentos mencionados anteriormente, los requisitos relacionados con el procedimiento de punto no cumplían las especificaciones de las pruebas rápidas.

Los parámetros técnicos que deben mejorarse:

40 1. Tiempos de incubación

- el tiempo objetivo es de 5 min totales, por ejemplo 2':2':1'
- 45 - puede realizarse una titulación del conjugado con el fin de evitar resultados falsos positivos o falsos negativos
- la sensibilidad actual (5':5':1') es +/- 10 mg/litro, pero debe mejorarse
- 50 - la coloración azul permite una buena discriminación visual, es posible una determinación semicuantitativa.

55 2. Etapas de lavado: demasiado engorrosas.

3. Diseño de la prueba con el fin de evitar equipo de laboratorio.

Ejemplo 2

60 Optimización del concepto de flujo a través

Durante el desarrollo de una prueba rápida para la detección de PCR, los inventores se centraron en la optimización de los siguientes parámetros técnicos: composición, calidad y tamaño de poro de la membrana (véase 2.1), optimización del sistema de reactivo marcado con enzimas para detectar el analito (en este caso, PCR) (véase 2.2), composición del tampón de recubrimiento (tampón de aplicación) (véase 2.3), composición y titulación del agente del compuesto de unión a analito, en este caso anticuerpo anti-PCR marcado con HRP, aplicación del procedimiento de unión (procedimiento de recubrimiento), procedimiento de bloqueo (tras el procedimiento de recubrimiento) (véase 2.4), almacenamiento/estabilidad de la membrana, estabilidad del resultado conservando (la coloración) y costes.

ES 2 295 227 T3

2.1 Selección de la membrana (composición - tamaño de poro)

La calidad y la composición de la membrana ejercen una influencia sobre la unión del agente de captura o el primer compuesto de unión a analito (anticuerpo anti-PCR) y la velocidad de flujo (muestra, conjugado y sustrato precipitante). Por tanto, es importante lograr una alta unión constante de la proteína con el fin de obtener una sensibilidad muy buena, una alta especificidad y una buena reproducibilidad. También es de gran importancia el diámetro de poro de la membrana.

Los inventores encuentran que las membranas con diámetros de poro de 1,2 μm y 0,8 inducen una velocidad de flujo demasiado rápida (en el plazo de algunos segundos) lo que da una mancha coloreada difusa difícil de interpretar.

Breve descripción de los experimentos

Se recubrieron membranas de S&S con un diámetro de poro de 1,2 μm y membrana de mdi con un diámetro de poro de 0,8 μm por medio de un procedimiento de manchado usando 3 o 5 μl de un anticuerpo anti-PCR. Una muestra positiva en PCR (concentración de 40 mg/l) se diluyó 1/25 en un tampón diluyente Tris (10 mM) que contenía el 1% de sacarosa. Los inventores observaron una velocidad de flujo demasiado rápida, es decir inferior a 10 segundos y un gran proceso de difusión. Además, tras la adición del conjugado, es decir anticuerpo anti-PCR marcado con HRP, el ruido de fondo, es decir coloración de fondo azul, fue demasiado intenso para permitir una buena lectura visual. La coloración de fondo se sometió a prueba mediante el uso del tampón diluyente únicamente. Por el contrario, una membrana de mdi con un diámetro de poro de 0,45 μm mostró señales de fondo aceptables y se seleccionó posteriormente. Aquí, la velocidad de flujo fue más lenta, es decir +/- 30 segundos.

Además, un tamaño de poro inferior, es decir 0,45 frente a 0,8 y 1,8 μm induce un área superficial mayor, por tanto una capacidad de unión superior. Además, un tamaño de poro pequeño permite evitar la difusión radial de los reactivos durante el flujo a través, dando como resultado la formación de una mancha coloreada bien conformada.

La selección final se realizó entre el tipo CN y el tipo CLN proporcionados por la empresa mdi (Advanced Microdevices (PVT) LTD. 21, Industrial Area, Ambala Cantt, 133 001 India), siendo ambas membranas de nitrato de celulosa.

La membrana de tipo CN, es una membrana lisa que no está soportada y que es relativamente frágil. Los inventores observaron coloraciones heterogéneas probablemente debido a las bolsas de aire que se desarrollan entre las almohadillas absorbentes y la membrana. Además, la velocidad de flujo para la muestra fue "demasiado lenta", más de 3 minutos.

Las membranas de tipo CLN están soportadas, reforzadas con papel lo que significa "soportadas" por papel, son fáciles de manejar e inducen el aspecto de una coloración homogénea. Dada la naturaleza del soporte, siempre hay un buen contacto entre la capa absorbente y la membrana, es decir no hay atrapamiento de aire. Además, la estructura ayuda a regular la velocidad de flujo de la membrana hasta un valor bajo, dando como resultado una sensibilidad mejorada. La CLN-040-SL53 tiene un tamaño de poro de 45 μm , un espesor de aproximadamente 480 μm y una capacidad de unión a proteínas de 103 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

La almohadilla absorbente (AP 120) usada en la capa absorbente tiene una propiedad especial y es la hinchazón parcial con la humectación con el fin de garantizar un buen contacto con la membrana. Esta almohadilla se obtuvo de la misma empresa mdi y tiene un espesor de aproximadamente 1550 μm .

2.2. Selección del sistema marcado

El método se optimizó de manera que se obtuviera una fácil interpretación visual de los resultados, lo que significa una señal colorada clara para las muestras positivas, pero también una señal muy baja para las muestras negativas, es decir ruido de fondo bajo. Además, la discriminación visual entre los resultados positivos bajos observados en caso de infecciones virales y bacterianas leves, es decir, con concentración de PCR de hasta 50 mg/l y los resultados positivos fuertes observados durante las infecciones bacterianas graves, es decir desde +/- 60 hasta 200 mg/l tenía que ser clara. Se obtuvo un sistema de prueba reproducible, es decir resultados coherentes dentro de diferentes lotes de membranas. De hecho, la determinación de la concentración de PCR es útil con el fin de evaluar el seguimiento del tratamiento, es decir antibióticos. Un dispositivo de ensayo es de bajo coste.

La señal visual formada final en las pruebas basadas en membranas puede formarse mediante partículas de látex coloreadas, partículas de oro, colorantes o enzimas. El uso de partículas de látex puede conducir a problemas de interpretación y no permite un resultado permanente. También puede producirse la auto-aglutinación, afectando a la especificidad del método. Las partículas de oro de buena calidad son relativamente caras. También pueden encontrarse algunos problemas de fabricación con reproducibilidad en lo que se refiere a la forma esférica y al tamaño. La bibliografía demostró que el tamaño de las partículas de oro era un factor crítico.

Los presentes inventores decidieron usar un conjugado, es decir anticuerpos anti-PCR humana purificados de origen de conejo acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sistema precipitante de TMB. A diferencia que

ES 2 295 227 T3

con el uso de partículas de oro, la presencia de PCR se revela por tanto mediante una reacción enzimática de una etapa que se detiene mediante el uso de un fijador, es decir una disolución de detención.

El uso de una disolución de fijación permite un registro permanente del resultado. Éste no es el caso con las partículas de oro para las que la lectura puede realizarse en el plazo de 5 minutos y para las que no puede retenerse el resultado. La reacción enzimática consiste en la reacción de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina con peroxidasa de rábano picante y peróxido de hidrógeno que forma un producto de oxidación de 1 electrón de catión de radical libre azul.

Las ventajas de una combinación de este tipo incluyen preparaciones de TMB comerciales, listas para usar, de alta calidad constante y con una larga vida útil de almacenamiento que están disponibles en el mercado. La fabricación de un reactivo de este tipo es fácil y reproducible. El uso de un sistema precipitante de este tipo permite el desarrollo de una coloración azul, es decir aguamarina, fácil de leer. El conjugado usado en esta configuración experimental puede titularse de modo que pueda seleccionarse la mejor dilución de este compuesto permitiendo la lectura correcta, reproducible y precisa. En combinación con un lector de reflectancia, este dispositivo de ensayo permite una normalización precisa de cada lote de membrana, lo que garantiza una buena reproducibilidad.

2.3 Optimización de los componentes

Membrana

La membrana es el factor más crítico con el fin de conseguir un buen resultado de prueba. Aun cuando se desconocen todavía los mecanismos exactos de unión, por ejemplo, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, se obtiene un alto nivel de unión a través del procedimiento de aplicación y el tampón de aplicación (recubrimiento) optimizados. Se escoge preferiblemente la nitrocelulosa debido a su carga neutra.

En el procedimiento de recubrimiento, las membranas se cortaron en tiras de 0,8 cm de ancho tal como resultaba adecuado para el dispositivo de flujo a través y se sumergieron lentamente en un baño llevado a TA y que contenía el tampón de aplicación y el compuesto de unión a analito. Puede mencionarse que si las tiras se sumergen en un tampón de aplicación frío, por ejemplo a 4°C, las tiras tienden a “replegarse” y disminuye la eficacia de la unión.

El tampón de recubrimiento (aplicación) presenta una salinidad muy baja y un carácter de pH básico (9,1 +/-0,1). El primer compuesto de unión a analito se aplicó en exceso utilizando un anticuerpo anti-PCR de antisuero policlonal con alta afinidad. Se diluyó 1/50 una reserva de anticuerpos que tenía una concentración de título de 10,0 mg/ml +/-1,0 en la disolución de aplicación, dando como resultado una concentración de unión de 0,2 mg/ml.

Composición del tampón de aplicación para 1 litro

1,2 g de Tris ICN 103133

8,8 g de NaCl Merck Eurolab (ME) 1723

Varios experimentos demostraron que la zona reactiva (nitrato de celulosa) puede estar en contacto directo con la disolución de aplicación. La inmersión dio los mejores resultados. Un método de procedimiento de recubrimiento de manchado dio peores resultados debido a la formación de manchas no homogéneas y difusas.

Se sometieron a prueba varios tiempos de incubación, es decir de inmersión, de desde 1 hora hasta 5 horas. Una incubación de 3 horas a TA (18-22°C) con agitación suave (agitador basculante) dio los mejores resultados. Tras la aplicación, las membranas no se lavan con el fin de evitar la “desorción” del compuesto de unión a analito debido a la presencia de agentes tensioactivos en el tampón de lavado. De hecho, la presencia de un detergente tal como Tween 20 que está presente usualmente en el tampón de lavado podría producir este efecto.

2.4 Procedimiento tras el recubrimiento (de bloqueo)

Se introdujo un procedimiento de este tipo en el concepto y se optimizó con el fin de conseguir un bajo ruido de fondo, pero también con el fin de evitar una etapa de lavado usualmente necesaria durante el método de FT (flujo a través). El objetivo era bloquear cualquier sitio libre restante en la membrana. El procedimiento tras el recubrimiento o de bloqueo se utiliza ampliamente en los métodos ELISA, es decir, usando sustratos solubles con el fin de bloquear los sitios libres restantes tras el procedimiento de recubrimiento.

Las tiras utilizadas en el método de mancha se bloquean generalmente, pero no siempre, con el fin de evitar un ruido de fondo demasiado alto inducido por la adsorción no específica del conjugado en la tira. En los métodos de FT, los lavados son obligatorios con el fin de eliminar el conjugado de partículas de oro no unidas, es decir el conjugado de anticuerpo y oro que puede absorberse en las membranas.

ES 2 295 227 T3

En el método según la presente invención, los sitios libres restantes tras el procedimiento de recubrimiento se bloquean usando BSA (albúmina de suero bovino) muy purificada a una concentración del 1% con el fin de evitar cualquier adsorción no específica del conjugado durante el flujo a través. No obstante, pueden usarse otras proteínas o componentes poliméricos tales como poli(alcohol vinílico), poli(pirrolidona vinílica) para el mismo fin.

5

Tras el procedimiento de recubrimiento, las tiras se sumergen inmediatamente por tanto en un segundo baño que contiene el agente de bloqueo. Las tiras se colocan con agitación suave (agitador basculante) durante 3 horas a TA (18-24°C).

10 *Composición del tampón de bloqueo (para 1 litro)*

	8,5 g de NaCl	MERCK EUROLAB	1723
	1,25 g de Na ₂ HPO ₄	"	1770
15	0,160 g de NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	"	1769
	1 g de timerosal	"	818957
	10 g de BSA	ICN	105133

Debido a la alta unión del compuesto de unión a analito en la membrana, este compuesto no se “desplazó” por la BSA que bloquea los sitios libres restantes. Las tiras se sumergieron en la disolución de bloqueo durante 3 horas con agitación suave. Se añadió timerosal como conservante.

También tras el procedimiento de bloqueo, las membranas no se lavaron con el fin de evitar la “desorción” del compuesto de unión a analito y los agentes de bloqueo debido a la presencia de agentes tensioactivos. De hecho, la presencia de un detergente tal como Tween 20 que usualmente está presente en el tampón de lavado podría producir este efecto.

Las tiras se secaron a 37°C durante 1 hora y entonces se colocaron durante la noche en una incubadora a 18-22°C con el fin de evitar la formación de polvo. La etapa de secado también puede realizarse durante la noche a 37° sin que esto tenga ningún efecto sobre el resultado final. Las tiras se empaquetaron entonces a vacío con el fin de protegerlas frente a la humedad y se almacenaron a TA.

El procedimiento de manipulación descrito anteriormente dio los mejores resultados con el procedimiento de flujo a través descrito más adelante en el presente documento (véase la sección 2.5).

El compuesto de unión a analito se usa en exceso; el tampón de aplicación complementado con el compuesto de unión a analito puede reutilizarse 2 veces si se congela a -20°C entre dos etapas de manipulación.

De manera similar, la disolución de bloqueo también puede reutilizarse 2 veces en el plazo de 1 mes, si se almacena a 4°C, entre 2 etapas de manipulación sin afectar a la eficacia del procedimiento de bloqueo.

2.5. *Procedimiento de FT*

La muestra, es decir suero o sangre completa, se diluyó 1/50 en el tampón diluyente. El tampón diluyente usado fue un tampón Tris de baja salinidad y que contenía BSA, es decir un 3 o un 5%. Se llevó a cabo la dilución, mediante el cual se añadieron 10 µl de la muestra de sangre al tubo de ensayo que contenía 500 µl de tampón diluyente. Este tubo de ensayo se cierra posteriormente y se mezcla.

50 *Preparación para 1 litro de tampón diluyente*

	1,2 g de Tris	ICN	103133
	8,8 g de NaCl	ME	1723
	50 g de BSA ref.	ICN	105033
55	1 g de timerosal	ME	818957

Se aplicaron 15 µl o una gota de la muestra diluida sobre la membrana y se dejó que la muestra se absorbiera a través de la membrana durante al menos 1 minuto. Usualmente, el tiempo de absorción es de aproximadamente 45”, es decir un intervalo de 30” hasta 1’30”. Este tiempo es más lento que el observado con otro método de FT. Se sabe que la sensibilidad de la prueba aumenta con la disminución de la velocidad de flujo. De hecho, velocidades de flujo demasiado rápidas, es decir de algunos segundos afectan a la sensibilidad del método.

A esto le siguió la adición de 25 µl o una gota de conjugado, es decir anticuerpo anti-PCR acoplado a HRP, 25 µl o una gota de TMB precipitante, 25 µl o una gota de disolución de fijación. Tras cada adición, se dejó que la disolución se absorbiera a través de la membrana. El resultado se leyó tras un mínimo de 2 minutos. De hecho, puede ser necesario esperar al menos 2 minutos antes de detener la reacción enzimática. Para un almacenamiento a largo plazo del resultado, se aconseja cubrir la mancha coloreada con una cinta Scotch, es decir de tipo 3M.

ES 2 295 227 T3

El procedimiento con los volúmenes mencionados de 15-25-25-25 μl induce una mancha coloreada homogénea de 3-4 mm de diámetro. Si debe obtenerse un diámetro más grande > 4 mm o si los volúmenes son superiores, por ejemplo con un dispensador de gotitas de 50 μl , la composición de tampón diluyente tiene que modificarse mediante la adición de sacarosa, es decir de un 10% hasta un 40%, lo que ralentiza la velocidad de flujo y permite evitar la coloración heterogénea.

Composición de la disolución de fijación (para 100 ml)

10	1 g sulfosuccinato de dioctilo	SIGMA	D 0887
	5 ml de dimetilformamida	”	D 8654
	19 ml de poli(alcohol vinílico) al 5%	”	P8136
	76 ml de H ₂ O (filtrada)		

15 2.6. Interpretación del resultado

2.6.1 Lectura visual = lectura semicuantitativa

20 Se estimó la concentración de PCR mediante la comparación de la respuesta a la prueba con una curva patrón preparada con PCR altamente purificada. Las seis zonas del gráfico se corresponden con las siguientes concentraciones: 11 mg/l, 27,5 mg/l, 69 mg/l, 91 mg/l, 137 mg/l y 275 mg/l. Alternativamente, pueden usarse otras concentraciones que cubran el intervalo de desde 1 mg/l hasta 500 mg/l.

Las muestras se interpretaron de la siguiente forma:

25	Color de respuesta a la prueba	Concentración de PCR
	- más claro que la zona de 11 mg/l	< 11 mg/l
30	- idéntico a una zona	De acuerdo con la zona
	- entre 2 zonas	Estimar un valor entre las zonas
	- más oscuro que la zona de 275 mg/l	> 275 mg/l

35 En el kit, se incluirá un gráfico de color que permite la comparación de la coloración de la muestra con la coloración de las concentraciones conocidas de PCR. Alternativamente, las manchas coloreadas podrían escanearse usando un lector de reflectancia tal como se trata más adelante.

40 2.6.2 Interpretación con el uso de un lector

Usando un lector de reflectancia, la medición de la intensidad de coloración es más precisa y permite determinar la concentración de PCR. La concentración de una muestra desconocida puede calcularse mediante la interpolación en una curva patrón obtenida con varias concentraciones de PCR purificada.

45 Ejemplo 3

Comparación con otro método existente

50 3.1. Objetivo del estudio

El método de FT optimizado se comparó con 2 métodos comercialmente disponibles.

Condiciones experimentales

55 Los inventores analizaron 50 muestras de suero que oscilaban desde una concentración de PCR muy baja hasta una alta que se había sometido a prueba mediante el método de nefelometría (método cuantitativo) usando el método de flujo a través de Bio ART, es decir el método semicuantitativo que aplica TMB precipitante y usando el método Nycomed, es decir el método de FT semicuantitativo que aplica partículas de oro.

60 3.2. Procedimiento

Las muestras se sometieron a prueba según el siguiente procedimiento:

65 a) FT BIO-ART (según la presente invención):

1. Usando una pipeta, se aplicaron 15 μl de muestra diluida (1/50) sobre la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran durante al menos 45 segundos.

ES 2 295 227 T3

2. Usando una pipeta (véase la tabla 4a) o un dispensador de gotitas (véase la tabla 4b) se aplicaron 25 μ l de conjugado, es decir anticuerpo anti-PCR humana de origen de conejo marcado con HRP con peroxidasa de rábano picante (HRP) con una concentración de 0,9 mg/l a la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran.
3. Usando una pipeta (véase la tabla 4a) o un dispensador de gotitas (véase la tabla 4b) se aplicaron 25 μ l de cromógeno (TMB precipitante) a la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran.
4. Usando una pipeta (véase la tabla 4a) o un dispensador de gotitas (véase la tabla 4b), se aplicaron 25 μ l de disolución de fijación a la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran.
5. Se realizó la lectura visual y/o la medición de la reflectancia tras 2 minutos de estabilización.

b) FT Nycomed:

Se usó el kit de Nycomed según el procedimiento recomendado descrito en el prospecto. Se utilizó el kit con el número de lote 10092464.

1. Usando una pipeta, se aplicaron 25 μ l de muestra diluida (1/40) o control positivo a la membrana recubierta. Se dejó que la muestra se absorbiera durante al menos 45 segundos.
2. Se aplicó una gota de conjugado a la membrana recubierta y se dejó que se absorbiera.
3. Se aplicó una gota de disolución de lavado a la membrana recubierta y se dejó que se absorbiera.
4. Se llevó a cabo la lectura, es decir visual o mediante el uso del lector de reflectancia tras 30 segundos de estabilización.

Con el fin de validar el lector de reflectancia, tanto los resultados de BIO ART como los de Nycomed se leyeron con el lector de reflectancia. Usando una curva patrón, se calculó la concentración de la muestra con el fin de prever la viabilidad de un método cuantitativo real.

3.3. Reactivos

Número de lote de la membrana: 00 6 4 (tabla 4a) y 00 1 15 (tabla 4b)

Número de lote de TMB precipitante: 5 DT 0629, fecha de caducidad: 06/01

Número de lote de la disolución de fijación: 0051, fecha de caducidad: 05/01

Conjugado: anticuerpo anti-PCR marcado con HRP diluido 1/700 (0,9 mg/l)

3.4. Interpretación de los resultados

3.4.1 Nycomed: lectura visual = lectura semicuantitativa

Se estimó la concentración de PCR mediante la comparación de la respuesta a la prueba con el gráfico de color de referencia proporcionado con el kit. Las cinco zonas del gráfico se corresponden con las siguientes concentraciones: 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l y 200 mg/l.

Las señales se interpretaron de la siguiente forma:

Color de respuesta a la prueba	Concentración de PCR
- más claro que la zona de 10 mg/l	< 10 mg/l
- idéntico a una zona	De acuerdo con la zona
- entre 2 zonas	Estimar un valor entre las zonas
- más oscuro que la zona de 200 mg/l	> 200 mg/l

3.4.2. BIO ART: lectura visual = lectura semicuantitativa

Se estimó la concentración de PCR presente en las muestras mediante la comparación de la respuesta a la prueba con una curva patrón preparada con PCR altamente purificada. Las seis zonas del gráfico que representa la curva patrón corresponden a las siguientes concentraciones: 11 mg/l, 27,5 mg/l, 69 mg/l, 91 mg/l, 137 mg/l, 275 mg/l. Pueden usarse otras concentraciones que cubran el intervalo de desde 10 mg/l hasta 250 mg/l.

ES 2 295 227 T3

La interpretación se guió usando los siguientes criterios:

	Color de respuesta a las prueba	Concentración de PCR
5	- más claro que la zona de 11 mg/l	< 11 mg/l
	- idéntico a una zona	De acuerdo con la zona
	- entre 2 zonas	Estimar un valor entre las zonas
10	- más oscuro que la zona de 275 mg/l	> 275 mg/l

3.4.3 Cálculo de los resultados con el lector de reflectancia

15 La coloración final se leyó usando el lector de reflectancia tal como se describe más adelante en el presente documento.

20 La concentración de PCR se calculó a partir de la curva patrón. Los resultados se expresan en mg/l tal como se enumera en las tablas 4a y 4b.

3.5. Resultados

25 Véanse las tablas 4a y 4b.

3.6. Conclusiones

30 A partir de la tabla 4a puede concluirse que no hay discrepancia en lo que se refiere a un resultado negativo frente a positivo, 3 muestras * (30, 34, 43) se clasifican en clases diferentes y según el lote de membrana, 5 muestras** (25/26/30/35/37) se clasifican de diferente forma. Con el fin de obtener siempre la misma señal para el mismo nivel de concentración, el conjugado puede titularse, por ejemplo esta titulación permite determinar la mejor dilución final que podría usarse en el experimento respectivo.

35 En la tabla 4b, los primeros resultados muestran que la cuantificación es viable. Dado que la concentración se calcula mediante la interpolación de la curva patrón, no puede calcularse una concentración precisa para valores inferiores a 10 mg/l. Son necesarios patrones adicionales, es decir con valores de 2 y 5 mg/l con el fin de calcular la concentración con precisión. Para las muestras que varían entre 10 y 50 mg/l, la correlación entre ambos métodos es buena. La muestra número 31 debe someterse a prueba de nuevo. Para las muestras que varían entre 51 y 150 mg/l, la correlación también es buena, excepto porque la muestra 39 tiene que someterse a prueba de nuevo. Para la lectura visual (véase la tabla 1a) los inventores observaron que tanto el método Nycomed como el método según la presente invención carecen de discriminación para las muestras que tienen una concentración de analito superior a 150 mg/l. Mediante el ajuste de la dilución del conjugado, puede superarse un problema de este tipo. Mediante el ajuste de la concentración de TMB, puede superarse un problema de este tipo.

45 Además de este estudio preliminar, se optimizaron los reactivos y se sometieron a prueba una segunda serie de muestras con concentraciones que oscilan desde 0,4 mg/l hasta 200 mg/l según el procedimiento de FT de BIO ART. Los resultados se compararon con los del método de Nycomed y con nefelometría. Se preparó una curva patrón preparada con PCR purificada con el fin de interpretar los resultados. Las seis concentraciones de la curva patrón de Bio ART fueron de 0 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 75 mg/l, 200 mg/l.

a) FIT BIO-ART (según la presente invención):

- 55 1. Usando una pipeta, se aplicaron 20 μ l de muestra diluida (1/50) sobre la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran durante al menos 45 segundos.
- 60 2. Usando un dispensador de gotitas (véase la tabla 4c) se aplicaron 25 μ l de conjugado, es decir anticuerpo anti-PCR humana de origen de conejo marcado con HRP con peroxidasa de rábano picante (HRP) con una concentración de 0,9 mg/l a la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran.
- 65 3. Usando un dispensador de gotitas (véase la tabla 4c) se aplicaron 25 μ l de cromógeno (TMB precipitante) a la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran.
4. Usando un dispensador de gotitas (véase la tabla 4c), se aplicaron 25 μ l de disolución de fijación a la membrana recubierta y se dejó que se absorbieran.
5. Se realizó la medición de la reflectancia tras 2 minutos de estabilización.

ES 2 295 227 T3

Los resultados se muestran en la tabla 4 c.

La adición de un 1 mg/l de patrón permite una mejor discriminación en los valores bajos, es decir < 10 mg/l. Para las muestras que varían entre 10 y 75 mg/l, la correlación entre ambos métodos es buena. La muestra número 31 se sometió a prueba de nuevo y mostró una concentración de 43,8 mg/l, lo que es más coherente con el resultado de nefelometría. Para las muestras que varían entre 75 y 150 mg/l, la correlación también es buena, excepto por la muestra 39 que todavía mostró un resultado inferior al de nefelometría (67 mg/l). En cuanto al método Nycomed, un valor superior a 200 mg/l no puede discriminarse fácilmente.

Ejemplo 4

Evaluación de la reproducibilidad de los resultados mediante el uso de un lector de reflectancia

4.1 Introducción

El lector es un lector de obtención de imágenes que permite la cuantificación de la señal coloreada mediante reflectancia. Se adaptó el lector para usarse para leer las señales obtenidas mediante el método de PCR de flujo a través, tal como se describe en la presente invención. Este lector permite la medición de una zona específica. Esta zona no se limita a una forma específica tal como un círculo.

Las ventajas de una cuantificación de este tipo son la evaluación de la reproducibilidad entre lotes, la titulación del conjugado con el fin de conseguir la misma señal para la misma concentración, la evaluación de la sensibilidad, la evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo y la normalización del procedimiento de control de calidad (especificaciones cuantitativas de “aceptación/rechazo”).

4.2 Condiciones de los experimentos

El procedimiento de FT se llevó a cabo según el procedimiento descrito en los ejemplos 3 y 4. Para cada experimento, se indican la membrana y la muestra usadas. La dilución realizada para el conjugado se menciona adicionalmente.

a) Número de lote de membrana 0064, muestra 48, conjugado 1/700

Se sometió a prueba el cuarto lote de membrana producido en junio (lote 00 6 4) usando un conjugado con una concentración de 0,9 mg/l. Una muestra de suero número 48 que tenía una concentración de 258 mg/l de PCR se diluyó 1/50 en el tampón Tris diluyente que contenía un 5% de BSA y se sometió a prueba 5 veces en 5 partes separadas de membrana (duplicado 1 (R1) a duplicado 5 (R5)). Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente (experimentos 3 y 4) y se realizó la lectura 2 minutos tras la fijación. La reflectancia se midió usando un filtro rojo (R), uno verde (G) y uno azul (B). Los resultados se interpretaron según la medición usando el filtro rojo, puesto que la diferencia en intensidades entre las diferentes manchas entre el 0 y los valores superiores es más pronunciada usando este filtro. Los 5 duplicados dieron los siguientes resultados: R1: 60,65 unidades de reflectancia (UR); R2 59,47 UR; R3 61,30 UR; R4 59,68 UR y R5 63,24 UR. La media de las señales fue de 60,8 UR, mostrando una desviación estándar de 1,5 UR. El coeficiente de variación (CV) fue del 2,5%.

b) Lote de membrana 0093

Se sometió a prueba el tercer lote producido en junio (00 6 3) en las condiciones que se han descrito anteriormente para el lote número 0064. Los resultados para los 5 duplicados mediante el uso del filtro rojo fueron: R1 66,72 UR; R2 70,05 UR; R3 68,10 UR; R4 68,54 UR y R5 68,02 UR. La media de las señales fue de 68,2 UR con una desviación estándar de 1,2 UR. El coeficiente de variación fue del 1,8%.

c) Lote de membrana 0094, muestra 48, conj. 1/700

Se sometió a prueba el cuarto lote producido en septiembre (00 9 4) en las condiciones descritas para el lote número 0064. Los resultados para los 5 duplicados mediante el uso del filtro rojo fueron R1 73,67 UR; R2 71,14 UR; R3 73,74 UR; R4 78,42 UR y R5 74,35 UR. La media de las señales fue de 74,3 UR con una desviación estándar de 2,6 UR. El coeficiente de variación fue del 3,5%.

d) Membrana 0064, muestra 30, conj. 1/700

Se sometió a prueba el cuarto lote producido en junio (00 6 4) en las condiciones descritas para el lote número 0064 pero con una muestra sometida a hemólisis (número 30) con una concentración de 52,7 mg/l. Una muestra sometida a hemólisis contiene restos de células sanguíneas que podrían influir en la lectura de las señales obtenidas. De esta manera, se sometió a prueba si compuestos contaminantes influían en la lectura del ensayo. Los resultados para los 3 duplicados mediante el uso del filtro rojo fueron: R1 76,38 UR; R2 67,60 UR y R3 78,56 UR. La media de las señales

ES 2 295 227 T3

fue de 74,2 UR con una desviación estándar de 5,9 UR. El coeficiente de variación (CV) fue del 7,8%. Los inventores concluyeron que se obtiene un mayor CV con la muestra sometida a hemólisis usando este método.

5 e) *Membrana 0093, muestra número 30 (sometida a hemólisis), conj. 1/700*

Se sometió a prueba el tercer lote producido en septiembre (00 9 3) en las condiciones descritas para el lote número 0064 pero con una muestra sometida a hemólisis (número 30) con una concentración de 52,7 mg/l. Los resultados para los 3 duplicados mediante el uso del filtro rojo fueron: R1 83,30 UR; R2 82,34 UR y R3 81,73 UR. La media de las
10 señales fue de 82,4 UR con una desviación estándar de 0,8 UR. El coeficiente de variación fue del 0,9%. A partir de estos resultados, los inventores concluyeron que no el método “en sí”, sino la membrana usada para este método, influyó en la variación.

15 f) *Membrana 0064, muestra 6, conj. 1/700*

Se sometió a prueba el cuarto lote producido en junio (00 6 4) en las condiciones descritas para el lote número 0064, pero usando la muestra (número 6) con una concentración de PCR de 2,0 mg/l. Los resultados para los 4 duplicados mediante el uso del filtro rojo fueron: R1 129,6 UR; R2 126,6 UR; R3 131,8 UR y R4 126,6 UR. La media de las
20 señales fue de 128,7 UR con una desviación estándar de 2,5 UR. El coeficiente de variación para este experimento fue del 1,96%.

25 g) *Membrana 0081, muestra 6, conj. 1/700*

Se sometió a prueba el primer lote producido en agosto (00 6 1) en las condiciones descritas para el lote número 0064 con la muestra (número 6) que llevaba una concentración de PCR de 2,0 mg/l. En este experimento, se sometieron a prueba diferentes volúmenes de reactivos y se analizó su influencia en las señales detectadas.

30 g.1 Volúmenes de reactivos utilizados: 15-25-25-25 μ l

Las señales que se obtuvieron fueron: R1 122,7 UR y R2 137,1 UR.

35 g.2 Volúmenes de reactivos utilizados: 15-15-15-15 μ l

Las señales que se obtuvieron fueron: R3 141,5 UR y R4 150,6 UR.

Los inventores observaron una pequeña diferencia en la intensidad de la coloración confirmada mediante la medición de la reflectancia.

40

h) *Prueba de la curva patrón en diferentes lotes de membranas*

Condiciones experimentales

45 Se preparó una curva patrón que contenía PCR altamente purificada en el tampón Tris diluyente que contenía un 3% de BSA. El procedimiento de flujo a través se realizó según la descripción anterior (experimentos 3 y 4) y se realizó la medición de la reflectancia con el filtro rojo en varios lotes de membranas.

50 *Objetivo del experimento*

Los inventores observaron una escasa discriminación visual para los lotes de membrana 00102 y 00107 y una buena discriminación para los lotes 00103 y 00106. El procedimiento de recubrimiento fue diferente según el número de lote y la fabricación (procedimiento de recubrimiento). Los lotes 00103 y 00106 se obtuvieron en tiras de 0,8 cm de ancho; los lotes 00102 y 00107 se obtuvieron en tiras más grandes de 8,5 cm de ancho. Según el procedimiento de
55 control de calidad, la medición precisa de la reflectancia permitirá aceptar o rechazar las membranas.

Los resultados se muestran en la tabla 5. Se indican los tamaños de las tiras de membrana utilizadas. Se muestran las unidades de reflectancia para cada concentración patrón utilizada.

60 Debido a la falta de discriminación en la intensidad del color, se rechazaron los lotes de membranas números 00102 y 00107. Las membranas 001030 y 00106 mostraron una buena discriminación visual, confirmada mediante la medición de la reflectancia y pasaron el procedimiento de control de calidad.

65

ES 2 295 227 T3

i) Pruebas de muestras en diferentes lotes de membranas

Condiciones experimentales

5 Se sometieron a prueba muestras con diversas concentraciones de PCR según el procedimiento de FT tal como se describió anteriormente (experimentos 3 y 4) con el fin de confirmar qué tamaño de tiras de membrana es el óptimo de usar para conseguir la mejor discriminación de color.

10 Se usaron las siguientes muestras y se diluyeron 1/50 en tampón Tris diluyente con un 3% de BSA: muestra número 45 (208 mg/l); muestra número 41 (157 mg/l); muestra número 37 (94 mg/l); muestra número 29 (48 mg/l); muestra número 21 (20 mg/l) y muestra número 9 (15 mg/l).

15 Los resultados se presentan en la tabla 6. Se indican los tamaños de las tiras usadas; se mencionan las unidades de reflectancia para cada concentración sometida a prueba para cada membrana sometida a prueba.

Los inventores concluyeron que no existe relación entre el tamaño de las tiras durante el procedimiento de recubrimiento y la calidad de los resultados.

20 j) Evaluación de los datos adicionales de reproducibilidad dentro de un ensayo

Condiciones experimentales preliminares

25 El FT se realizó según la descripción anterior (experimentos 3 y 4). Se sometieron a prueba 3 muestras que llevaban diferentes concentraciones de PCR en 4 duplicados. Se midió la reflectancia y se calculó el coeficiente de variación. Se usaron las siguientes muestras y se diluyeron 1/50 en tampón Tris diluyente complementado con un 3% de BSA: muestra número 41 (157 mg/l); muestra número 29 (47,8 mg/l) y muestra número 15 (9 mg/l).

30 Los resultados se presentan en la tabla 7a. Se indican las unidades de reflectancia para cada muestra usada. Se muestra la media de las señales determinadas, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada grupo de mediciones.

Datos adicionales de las condiciones experimentales

35 Además de esto, se llevaron a cabo pruebas exhaustivas con el fin de estudiar la reproducibilidad dentro de un ensayo. El FT se realizó según la descripción anterior (experimentos 3 y 4) en diferentes números de lote de membranas. Diferentes muestras con concentraciones que oscilaban desde 1 hasta 368 mg/l y la curva patrón (preparada con BSA altamente purificada) con un patrón de desde 1 hasta 200 mg/l se diluyeron en tampón Tris complementado con un 3% de BSA y se sometieron a prueba en diferentes duplicados de diferentes membranas. Se midió la reflectancia y se calcularon la media, la desviación estándar y el CV. Para cada experimento se indican los números de lote de los reactivos. Los resultados se presentan en las tablas 7b a 7g.

La reproducibilidad dentro de un ensayo es inferior al 5% y puede ser de tan solo el 1%.

45

k) Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos

Condiciones experimentales preliminares

50 Se llevó a cabo el procedimiento de FT según la descripción anterior (experimentos 3 y 4). Se sometió a prueba la curva patrón en diferentes lotes de membrana, es decir tiras en diferentes fechas con el fin de comprobar la reproducibilidad del método (resultados precisos) independientemente de las condiciones de la prueba tales como la temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la tabla 8a.

Datos adicionales de las condiciones experimentales

55 Además de esto, se llevaron a cabo pruebas exhaustivas con el fin de estudiar la reproducibilidad entre ensayos. El FT se realizó por diferentes usuarios según la descripción anterior (experimentos 3 y 4) en diferentes números de lote de membranas en días diferentes. Diferentes muestras con concentraciones que oscilaban desde 1 hasta 368 mg/l y la curva patrón (preparada con BSA altamente purificada) con patrón desde 1 hasta 200 mg/l se diluyeron en tampón Tris complementado con un 3% de BSA y se sometieron a prueba en diferentes duplicados de diferentes membranas. Se midió la reflectancia y se calcularon la media, la desviación estándar y el CV. Para cada experimento se indican los números de lote de los reactivos. Los resultados se presentan en las tablas 8b a 8f. Los CV son inferiores al 10% y pueden ser de tan solo el 1%.

65

ES 2 295 227 T3

1) Evaluación de otros datos adicionales de TMB precipitante

Objetivo 1: Se sometió a prueba otra fuente de TMB precipitante (proporcionada por otra empresa) con el fin de superar la falta de discriminación para los valores altos en PCR tal como se muestra en la tabla 4b.

Se compararon dos disoluciones diferentes. Se obtuvo una disolución de TMB "A" de Seramun (15754 Dolgenbrodt, Alemania), y se comparó con una disolución de TMB "B" obtenida de D-TEK (7000 Mons, Bélgica).

Condiciones experimentales

Se preparó una curva patrón en tampón Tris diluyente y se realizó el procedimiento de FT usando un dispensador de gotitas, tal como se describió anteriormente (experimentos 3 y 4). Los resultados se muestran en la tabla 9a. Se indican las unidades de reflectancia para cada concentración usada utilizando los diferentes agentes de TMB (TMB "A" y "B").

Conclusión

Los resultados mostraron que TMB "B" induce una mejor discriminación en comparación con TMB "A". Tal hallazgo confirmó la variación de la calidad según la fuente.

Objetivo 2: Con el fin de garantizar una buena reproducibilidad, se comparó un nuevo lote de TMB con el lote anterior en las mismas condiciones de prueba en curva patrón.

Condiciones experimentales

Se sometieron a prueba 2 números de lote de TMB en una curva patrón purificada que oscilaba desde 5 hasta 100 mg/l y 2 muestras en el lote de membrana 1051.

La variación entre los 2 lotes se calculó mediante la razón:
$$\frac{\text{Reflectancia del lote de referencia}}{\text{Reflectancia del nuevo lote}}$$

Los resultados se muestran en la tabla 9b.

Conclusión

El nuevo lote da resultados comparables a los del anterior (variación del 1% entre ambos lotes).

Objetivo 3: Con el fin de garantizar una buena reproducibilidad, se comparó un nuevo lote de TMB con el lote anterior en las mismas condiciones de prueba de las muestras.

El FT se realizó según la descripción anterior (experimentos 3 y 4) en el lote de membrana 1065 (producido en junio de 2001). Se sometieron a prueba 2 números de lote de TMB en 2 muestras y el tampón diluyente únicamente (valor blanco) por triplicado con un dispositivo de dispensación diferente para cada uno de los duplicados. Se midió la reflectancia y se calcularon la media, la desviación estándar y el CV. Los resultados se muestran en la tabla 9c.

Conclusión

El nuevo lote da resultados comparables al anterior dentro de la variación entre ensayos.

m1). Determinación preliminar de la menor concentración que puede detectarse

Se preparó una curva patrón que oscilaba desde 2,5 mg/l hasta 360 mg/l en un tampón Tris diluyente que contenía un 3% de BSA. Se llevó a cabo el procedimiento de FT según la descripción anterior (experimentos 3 y 4).

Condición experimental

Se utilizó la membrana 00 6 4, el conjugado de anticuerpo anti-PCR marcado con HRP con una dilución de 1:700, dando como resultado una concentración final de 0,9 mg/l. Se compararon dos TMB comerciales: TMB-A de D-TEK (Bélgica) y TMB-B de Seramun (Alemania). Los resultados se muestran en la tabla 10 a. Se midieron las unidades de reflectancia para cada valor patrón (se indica en mg/l).

ES 2 295 227 T3

Conclusión

En este lote, el valor inferior, es decir diferente de 0 que podía detectarse, era de 2,5 mg/ml. Pueden discriminarse valores de entre 180 y 360 mg/l.

m2). *Datos adicionales relacionados con la menor concentración que puede detectarse.*

Condiciones experimentales

Se preparó una curva patrón que oscilaba desde 0 mg/l (blanco) hasta 10 mg/l en un tampón diluyente que contenía un 3% de BSA. Se sometió a prueba cada concentración en 4 duplicados en diferentes lotes de membrana. Se llevó a cabo el procedimiento de FT según la descripción anterior. Se calcularon la media, la desviación estándar y el CV. Un análisis estadístico (media +/- 1,5 desviación estándar (DE)) determinó el menor valor diferente de cero que puede detectarse. Los resultados se muestran en las tablas 10 b y 10c.

Conclusiones

El menor valor que puede detectarse con un lector de reflectancia es de 1 mg/l.

4.3 Conclusiones generales

Mediante una medición precisa de la mancha coloreada, el lector de reflectancia permite la puesta en práctica del procedimiento de control de calidad y las especificaciones solicitadas. El coeficiente de variación dentro de un ensayo puede ser de tan solo el 1% hasta el 7%, lo que es totalmente aceptable para una prueba rápida. Usando la misma dilución final del conjugado, el coeficiente de variación entre ensayos es inferior al 10% para los diferentes lotes de membrana. Mediante la titulación del conjugado, puede obtenerse un coeficiente de variación inferior. Una escasa discriminación visual siempre se confirma mediante los valores de la reflectancia obtenidos con el lector.

Ejemplo 5

Detección de anticuerpos anti-mitocondriales (tipo M2) mediante el método de FT

5.1 Introducción

El antígeno M2, es decir, piruvato deshidrogenasa, es un marcador específico para el diagnóstico de la cirrosis biliar primaria (CBP). La detección de los anticuerpos anti-M2 es una herramienta específica para el diagnóstico de la CBP diferenciada de otras enfermedades hepáticas.

5.2 Experimento A

Se recubrieron membranas de tipo CLN de mdi (Advanced Microdevices) con un diámetro de poro de 0,45 μm con un complejo de deshidrogenasa altamente purificado (Sigma ref. P5194) y se han bloqueado según los procedimientos descritos en los encabezados 2.3 y 2.4. Se revelaron anticuerpos humanos anti-M2 (IgG/IgM) mediante el uso de Fab'2 anti-IgG humana marcado con HRP (Dako ref. P406) y Fab'2 anti-IgM humana marcado con HRP (Dako ref. P322), con concentraciones que oscilaban desde 0,2 hasta 0,3 mg/l, seguido por la adición de TMB precipitante. Las muestras se diluyeron 1/100 en un tampón Tris diluyente que contenía un 5% de BSA y se realizó el FT tal como se describió anteriormente (experimentos 3 y 4).

Resultados

Una concentración de recubrimiento de 0,115 mg/ml correspondiente a una actividad enzimática de 0,54 unidades/ml dio buena discriminación visual entre los resultados negativos, bajos positivos (+) y positivos (++). El ruido de fondo (tampón diluyente únicamente) fue aceptable.

5.2 Experimento B

Se recubrieron membranas de tipo CLN de mdi (Advanced Microdevices) con un diámetro de poro de 0,45 μm con complejo deshidrogenasa altamente purificado a una concentración de 0,24 mg/ml (Sigma ref. P5194) y se bloquearon según el procedimiento descrito en los encabezados 2.3 y 2.4.

Se revelaron los anticuerpos anti-M2 humanos (IgG/IgM) mediante el uso de Fab'2 anti-IgG humana marcado con HRP (Dako ref. P406) y Fab'2 anti-IgM humana marcado con HRP (ref. Dako P322) con concentraciones que oscilaban desde 0,2 hasta 1,0 mg/l, seguido por la adición de TMB precipitante. Las muestras se diluyeron 1/50 (dado que esta dilución dio la mejor discriminación entre resultados positivos y negativos) en un tampón Tris diluyente que contenía un 3% de BSA y se realizó el FT tal como se describió anteriormente (experimentos 3 y 4). Los resultados se interpretaron mediante la comparación de la intensidad de la coloración con la intensidad del punto de corte (límite

ES 2 295 227 T3

de positividad). También se midió la reflectancia. Dado que no hay correlación entre la gravedad de la enfermedad y el nivel de anticuerpos anti-M2, un “sí/no”, es decir presencia o ausencia de anticuerpos anti-M2 es suficiente y no es necesaria la cuantificación.

- 5 Las muestras sometidas a prueba mostraron un patrón citoplasmático típico positivo con el método de inmunofluorescencia. Sin embargo tal método inmunofluorescente no permite diferenciar el anticuerpo anti-M2 de otros tipos de anticuerpos anti-mitocondriales (anti-M4, M5, M9).

Objetivo del estudio

- 10 a) Los resultados del FT se compararon con los del método ELISA para la detección de anticuerpos anti-M2. El método de M2 ELISA es un método automatizado para el que se obtienen resultados en el plazo de 2 h. También se estudió la reproducibilidad entre ensayos.

- 15 b) Se estudió la reproducibilidad entre ensayos (entre ensayos y dentro de un ensayo). Los resultados se muestran en las tablas 11 a y 11 b.

Interpretación de los resultados

- 20 ELISA: resultado positivo si la densidad óptica es $>$ que la DO para el control de punto de corte.

FT: resultado positivo si la UR es superior al valor de UR para el control de punto de corte.

- 25 Hay una buena correlación (100%) con el método ELISA. No se observan discrepancias en lo que se refiere a los resultados positivos frente a los negativos. La reproducibilidad entre ensayos es inferior al 10%.

Ejemplo 6

- 30 *Detección de factores reumatoides mediante el método de FT*

6.1 Introducción

- 35 Los factores reumatoides son inmunoglobulinas humanas, es decir que pertenecen principalmente al isotipo IgM dirigido contra las inmunoglobulinas humanas o animales. La detección de los factores reumatoides es muy útil en el diagnóstico de la artritis reumatoide.

6.2 Experimento

- 40 Se recubrieron membranas de tipo CLN de mdi (Advanced Microdevices) con diámetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$ con inmunoglobulinas humanas purificadas (Sigma ref. 068H4858) y se bloquearon según los procedimientos descritos en los encabezados 2.3 y 2.4. Se revelaron factores reumatoides de tipo M mediante el uso de Fab'2 anti-IgM humana marcado con HRP (Daka ref P322), con una concentración de $\pm 1,5 \text{ mg/l}$, seguido por la adición de TMB precipitante. Las muestras se diluyeron 1/100 en un tampón Tris diluyente que contenía un 5% de BSA y se realizó el FT tal como se describió anteriormente.

6.3 Resultados

- 50 Con una concentración de recubrimiento de $0,53 \text{ mg/ml}$, la discriminación visual entre las muestras negativas ($<25 \text{ UI/ml}$) y los resultados positivos ($\pm 200 \text{ UI/ml}$) es aceptable.

Ejemplo 7

- 55 *Detección de Salmonella*

7.1 Introducción

- 60 La detección de posible contaminación bacteriana en alimentos es el objetivo de las recomendaciones del Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APCC). La *Salmonella* es una de las principales bacterias responsables del envenenamiento masivo de los alimentos. Los métodos clásicos, tales como el cultivo, la selección mediante el crecimiento en medios específicos y la identificación bioquímica son laboriosos y llevan mucho tiempo. Además, diferentes bacterias pueden compartir las mismas propiedades bioquímicas, lo que puede inducir a una identificación errónea. Los anticuerpos específicos dirigidos frente a antígenos bacterianos han hecho posible ahora desarrollar métodos para la rápida detección de patógenos de origen alimentario. El uso de tal método de detección rápido permite
65 una identificación y detección más rápidas. El objetivo era desarrollar un FT para la detección de *Salmonella sp.*

ES 2 295 227 T3

7.2 Condiciones experimentales

Se recubrió la membrana tipo CLN de mdi (Advanced Microdevices) con un diámetro de poro de 0,45 μm con un anticuerpo de captura monoclonal purificado mediante cromatografía A, específico para *Salmonella typhimurium* (Biodesign ref. C65636M) con una concentración de 0,1 mg/ml. Los procedimientos de recubrimiento y posteriores al recubrimiento son los descritos en las secciones 2.3 y 2.4., excepto porque el tiempo de incubación para el procedimiento de recubrimiento fue de 5 horas con agitación suave a TA (18-24°C) y de 1 ó 2 hora(s) para el procedimiento tras el recubrimiento.

Mientras tanto, se sembró en placa una *Salmonella typhimurium sp.* de referencia (Colección Americana de Cultivos Tipo ref. ATCC 14028, facilitada por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gent) en un medio específico (agar nutriente) y se incubó en condiciones aerobias durante 24 horas a 37°C.

a) Procedimiento de pruebas para la identificación

Para un procedimiento de este tipo, se usó un dispositivo de prueba más grande (zona de prueba de 1 cm) con un número mayor de filtros (8) (almohadillas adsorbentes). Se diluyó un cultivo puro de *Salmonella typhimurium* en agua fisiológica. Se transfirieron 200 μl de tal suspensión a la membrana y se dejó que se absorbieran. La presencia de *Salmonella* se reveló mediante 200 μl de un segundo anticuerpo marcado con HRP (anticuerpo de conejo anti-*Salmonella* conjugado con peroxidasa polivalente para los antígenos “O” y “H” de *Salmonella* (concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, Biodesign ref. B65704R) seguido por la adición de 200 μl de TMB precipitante. La coloración se detuvo mediante 200 μl de disolución de fijación. Hubo una clara mancha azul que indicaba la presencia de *Salmonella typhimurium*.

b) Posible cuantificación

Con el fin de evaluar una posible cuantificación, se preparó una curva patrón de *Salmonella typhimurium* que oscilaba desde $5,3 \times 10^7$ hasta $7,0 \times 10^1$ con disolución hipotónica y se sometió a prueba con FT. Se contaron las diferentes diluciones para su cuantificación. Para determinar el rendimiento del procedimiento de FT, se usó un dispositivo de prueba más grande, es decir una zona de prueba de 1 cm con un mayor número de filtros (8) (almohadillas adsorbentes). Se transfirieron 500 μl de cada dilución a la membrana y se dejó que se absorbieran. Se utilizaron 2 procedimientos para la dispensación de la muestra que fue de $2 \times 250 \mu\text{l}$ de muestra, es decir lo que significa una primera absorción de 250 μl seguido por un segundo depósito de 250 μl de muestra y un lavado de 500 μl de muestra de una vez.

La presencia de *Salmonella* se reveló mediante 500 μl de un segundo anticuerpo marcado con HRP (anticuerpo de conejo anti-*Salmonella* conjugado con peroxidasa polivalente para los antígenos “O” y “H” de *Salmonella* (conc. 4 $\mu\text{g/ml}$, Biodesign ref. B65704R) seguido por la adición de 200 μl de TMB precipitante.

La coloración se detuvo mediante 500 μl de disolución de fijación. Se midió la reflectancia. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Hay una disminución en la intensidad de la coloración azul medida mediante unidades de reflectancia según la concentración bacteriana, lo que significa que la cuantificación es posible. Un lavado de de 500 μl de muestra de una vez indujo una mancha más coloreada.

Ejemplo 8

Uso de membrana de nailon para la detección de proteína PCR

El nailon es una poliamida sintética lineal que termina o bien con grupos terminales de amina primaria (cargada positivamente) o bien de carboxilato (cargado negativamente). Dado que las membranas de nailon poseen propiedades químicas de superficie diferentes a las de la nitrocelulosa (que es neutra), las propiedades de unión son diferentes.

Condiciones experimentales

Con el fin de estudiar las capacidades de unión del nailon, las membranas de la empresa CUNO se recubrieron según el procedimiento descrito en la sección 2.3, con 10 mmol o 25 mmol de tampón Tris. Se sometieron a prueba diferentes procedimientos de bloqueo, o bien con BSA (condición A), o bien con disoluciones poliméricas tales como poli(alcohol vinílico) (máximo del 0,1%) o polivinilpirrolidona (máximo del 1%) combinados con proteínas de la leche en polvo desnatada (condición B). Se utilizó nailon de tipo C de la empresa Cuno de 0,45 μm de diámetro con la menor razón de grupos terminales de amina con respecto a carboxilato, dando como resultado una carga positiva baja. Las muestras se sometieron a prueba según el procedimiento descrito en los ejemplos 3 y 4.

ES 2 295 227 T3

Resultados

Mediante el uso de BSA como agente de bloqueo (condición), se observó una mancha coloreada para las muestras positivas, pero se observó cierto ruido de fondo significativo para la muestra negativa. La discriminación entre los resultados positivos y negativos era escasa. Las membranas bloqueadas con disoluciones de polímeros y con proteína de la leche en polvo desnatada también dieron malos resultados (manchas moteadas). El primer tiempo de absorción fue demasiado rápido y se observó un fenómeno de difusión.

Dado que están implicados diferentes procesos de unión para la unión sobre la membrana de nailon, puede llevarse a cabo una nueva optimización de reactivos si se usan tales membranas. No obstante, se aplica el concepto general tal como se presenta en la presente invención.

Ejemplo 9

Influencia de la molaridad de Tris y del pH

Se estudió la influencia de la composición (molaridad) y del pH del tampón diluyente aplicado.

La composición del tampón diluyente varió según las condiciones A, B y C (véase más adelante).

Procedimiento y condiciones experimentales

Las muestras se diluyeron 1/50 en el diluyente A, B y C y se sometieron a prueba adicionalmente según los ejemplos 3 y 4.

Composición del diluyente (para 1 l):

Condición A

Lote 1111A y 1112: 0,12 g de Tris
0,88 g de NaCl \Rightarrow pH 7,36
30 g de BSA

Este tampón está adaptado para "muestra de sangre completa" y permite una hemólisis completa de los glóbulos rojos debido a la baja concentración de NaCl, lo que induce condiciones hipotónicas que conducen a la hemólisis. El pH es neutro.

Condición B

Lote 1051: 1,2 g de Tris
8,8 g de NaCl \Rightarrow pH 9,6
30 g de BSA

Este tampón está adaptado para muestras de suero pero no permite una hemólisis completa de los glóbulos rojos en caso de que se someta a prueba sangre completa. El pH es básico.

Condición C

Lote 1113: 1,2 g de Tris
0,88 g de NaCl \Rightarrow pH 10,5
30 g de BSA

Este tampón induce hemólisis de los glóbulos rojos, pero con un pH básico. Los resultados se muestran en la tabla 13.

ES 2 295 227 T3

No hay diferencia estadística en los resultados según la composición del tampón. Sin embargo, un pH básico aumenta la velocidad de flujo a través de la membrana. Se seleccionó la composición C.

Reactivos		
A	B	C
Membrana: 1062	Membrana: 1062	Membrana:
Conjugado: 1083	Conjugado: 1051	Conjugado: 1083
Diluyente: 1111 y 1112	Diluyente: 1051	Diluyente: 1113
TMB:1021	TMB 1021	TMB: 1021
Disolución de fijación: 1081	Disolución de fijación: 1081	Disolución de fijación: 1081

Ejemplo 10

Comparación con otro método rápido para la detección de PCR

Introducción

El kit de FT para PCR se ha tomado como referencia frente al método rápido para la detección de PCR mediante inmunoturbidimetría de la empresa ORION. El usuario final fue la unidad de urgencias de un hospital. Las muestras procedían de pacientes que manifestaban signos de infecciones virales o bacterianas. En caso de una concentración significativa de PCR (> 50 mg/l), el paciente se trató con antibióticos. El método de ORION es un método cuantitativo rápido basado en la inmunoturbidimetría, pero que requiere un lector para la interpretación de los resultados. Un método de este tipo no permite la interpretación visual del resultado.

Objetivo del estudio

Se sometieron a prueba 47 muestras, que oscilaban desde negativas en su concentración de PCR hasta positivas altas, según las instrucciones del kit de Orion.

Número de muestras positivas sometidas a prueba: 17 (36% del número total de muestras)

Número de muestras negativas sometidas a prueba: 30 (64% del número total de muestras)

El método de FT de BIO ART se realizó según el experimento descrito en la sección 3.

Interpretación de los resultados

Los resultados se interpretaron cuantitativamente con Orion (medición de la concentración) y semicuantitativamente con BIO ART (comparación de la coloración azul con un gráfico de color de referencia con las siguientes concentraciones de 10-25-75 y 200 mg/l). Los resultados se muestran en la tabla 14a-14e. Hay una buena correlación para las muestras negativas (tabla 14a). La concordancia es del 90% (27/30 muestras se correlacionaron bien). Tres muestras (12/15/3) se interpretan como bajos positivos con BIO ART y negativos con Orion. Dado que no se disponía de datos clínicos para estas 3 muestras, no pudo extraerse ninguna conclusión definitiva con respecto a la posibilidad de, o bien resultados falsos positivos para BIO ART, o bien resultados falsos negativos para Orion. Para las muestras de bajo positivo (tabla 14b), hay una correlación del 92% entre ambos métodos (11/12 muestras). Una muestra (31) presenta una concentración de 25-50 mg/l con el método de BIO ART y de 25 mg/l con Orion. Sin embargo, tal diferencia no induce ninguna clasificación o diagnóstico erróneos. Las cuatro muestras positivas (tabla 14c) se clasifican de manera similar tanto con BIO ART como con Orion. Sólo la muestra positiva alta (número 37, véase la tabla 14d) se sometió a prueba y tiene una concentración de 200 mg/l con BIO ART y de 112 mg/l con Orion. El nivel del punto de corte fue de 8 mg/l para Orion y de 10 mg/l para BIO ART, lo que significa que las muestras con una concentración inferior a 8 ó 10 mg/l presentan niveles normales de PCR.

Conclusión

1. *Correlación en las muestras positivas*

5 No hay ningún resultado falso negativo con el método de BIO ART (se encuentra que todas las muestras que son positivas con Orion son positivas con el método de BIO ART). La correlación en las muestras positivas es por tanto del 100%. Además, 16 muestras de 17 (excepto el número 31) se clasifican en el mismo intervalo de concentración

10 2. *Correlación en las muestras negativas, véase la tabla 4a)*

Tras muestras (números 12/15/3) son ligeramente positivas con BIO ART y negativas con Orion. En ausencia de datos clínicos o de un tercer método adicional, no puede extraerse ninguna conclusión con respecto a la posibilidad de o bien resultados falsos positivos (método de BIO ART) o bien un resultado falso negativo (Orion). Además, estos tres resultados bajos positivos de BIO ART no inducen a un diagnóstico erróneo.

3. *Conclusión general*

20 Un estudio de este tipo indicó que la interpretación visual de los resultados con el método de FT de BIO ART es válida para la interpretación. El FT de BIO ART presenta los mismos rendimientos técnicos que el otro método rápido. Sin embargo, además de este estudio, se ha decidido incluir un patrón adicional de 1 mg/l con el fin de mejorar la discriminación visual entre 0 y 10 mg/l.

25 **Bibliografía**

Enfermedades autoinmunitarias

Lemoine F.M. Intérêts clinique de la recherche des auto-anticorps. *Medical trends* 6/1992.

30 **Humbel** RL. Centre hospitalier du Luxembourg. *Cources related to auto-immunity*. 1990-1994. Université de Liège.

35 **Abuaf** N., **Johanet** C. y **Homberg** JC. “Les autoanticorps anti-tissues non spécifiques d’organe”. 2e journée d’immunopathologie de l’hôpital Rothschild OPTION BIO n°51 (suplemento)

Sturgess, A. -Recently characterised autoantibodies and their clinical significance *Aust NZ J Med* 1992; 22: 279-289.

40 **Mc Neil** HP y **Krilis** SA Antiphospholipid antibodies *Aust Nz J Med* 1991; 21: 463-475.

de **Rooij** *et al.* Use of recombinant RNP peptides 70K and A in an ELISA for measurement of antibodies in mixed connective tissue disease: a longitudinal follow up of 18 patients. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 391-395.

45 **Whittigham** S. *et al.* Serological diagnosis of primary Sjögren syndrome by means of recombinant La (SSB) as nuclear antigen. *Lancet*, 1987; 8549:1-3.

Mathews MB y **Bernstein** RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl tRNA synthetase. A model for autoimmunity. *Nature*, 1983; 304: 177-179.

50 Le **Roy** *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis); classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988; 15: 202-205.

55 **Tan** *et al.* Anti-nuclear antibodies (ANA’s): diagnostically specific immune markers and clues towards the understanding of systemic auto-immunity. *Clin Immunol Immunopath* 1988; 47: 121-141.

Tan Eng. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for auto-Immune diseases and probes for cell biology. *Advances in Immunology* vol 44; 93-151, 1989 Academic Press.

60 **Hochberg** MC *et al.* Systemic Lupus Erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine* 1985; 64: 285-295.

Proteína PCR

65 **Lindback** S *et al.* The value of C-reactive protein as a marker of bacterial infection in patients with septicaemia, endocarditis and influenza. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 543-9.

ES 2 295 227 T3

Morley J y Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann NY Acad Sci* 1982; 389: 406-18.

Whicher J et al. Acute phase response of serum amyloid A protein and C-reactive protein to the common cold and influenza. *J Clin Pathol* 1985; 38: 312-6.

Pepys M y Baltz M. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34: 141-212.

Chambers RE et al. Acute phase protein in inflammatory disease. *Lab* 1988; 1: 29-37.

Mc Cabe Re y Remington JS. C-reactive protein in patients with bacteremia. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 317-9.

Mackie et al. C-reactive protein for rapid diagnosis of infection in leukaemia. *J Clin Pathol* 1979; 32: 1253-6.

Angerman N et al. C-reactive protein in the evaluation of antibiotic therapy for pelvic infections *J Reprod Med* 1980; 25: 65-7.

Philips A y Andrews P. Rapid determination of C-reactive protein levels; semi-quantitative versus quantitative. *J Paediatrics* 1987; 110: 263-8.

Komorski et al. Quantitative measurement of C-reactive protein in acute otitis media. *Clin Lab Observ* 1987; 111: 81-4.

Claus DR et al. Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera. *J Lab Clin Med* 1976; 87: 120-8.

Grützeimer S y von Schenk H. Four immunochemical methods for measuring C-reactive protein in plasma compared. *Clin Chem* 1989; 35: 461-3.

Wadsworth C y Wadsworth E. Efficacy of latex agglutination and quantification methods for determination of C-reactive protein in pediatric sera. *Clin Chem Acta* 1984; 138: 309-18.

Collet-Cassart D et al. A quantitative C-reactive protein assay using latex agglutination in microtiter plates. *J Immunol Methods* 1989; 125:137-41.

Hulman G et al. An accurate, simple and rapid test for detecting elevated levels of C-reactive protein in serum by agglutination of fat emulsion. *Clin Chim Acta* 1986; 156: 337-40.

Price CP et al. Development and validation of a particle enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein. *J Immunol Methods* 1987; 99: 205-11.

Highton J y Hessian P. A solid-phase enzyme immunoassay for C-reactive protein: clinical value and the effect of rheumatoid factor. *J Immunol Methods* 1984; 68: 185-92.

Käpyaho K et al. Rapid determination of C-reactive protein by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies. *Scand J Clin Lab Invest* 1989; 49: 389-93.

Buitago MG et al. Clinical evaluation of a fluorescence polarization immunoassay for quantifying C-reactive protein (Tech Brief). *Clin Chem* 1988; 34: 595-6.

Hjortdahl P et al. C-reactive protein: a new rapid assay for managing infectious disease in primary health care. *Scand J Prim Health Care* 1991; 8: 20-6.

Urdal P et al. Rapid Immunometric measurement of C-reactive protein in whole blood. *Clin Chem* 1992; 38: 580-4.

M2

P.A. Berg y R. Klein. Autoantibody patterns in Primary Biliary Cirrhosis. Auto-immune liver diseases. Krawitt E.L. and Wiesner editors. *Raven Press*. 1991. Páginas 121-142.

Berg E.L y R. Klein. Antimitochondrial antibodies in primary Biliary Cirrhosis and other disorders: definition and clinical relevance. *Dig. Dis.* 1992, 10: 857-907

ES 2 295 227 T3

Factores reumatoides

Bampton et al. 1985. Measurement of Rheumatoid factors by an anzyme-linked immunosorbent assay and comparison with other methods. *Annals of Rheumatic Diseases*. 44: 13-19.

Stone R. et al. 1987. Clinical value of ELISA assays for IgM and IgG Reumatic factors. *J. Clin. Pathol.* 40: 107-111.

Alergia

Kuby J. *Immunology* (Capítulo 16) Eds. W.H. Freeman and Company, 1992.

Mygind N. Essential Allergy. *Blackwell Scientific Publications*, 1986.

Dodet Allergy: une cascade de reactions. *BIOFUTUR* julio/agosto de 1989.

David B., Allergenes et desensibilisation. *Rev. Fr. Allergol.* 1989, 26: 29-37.

O'Byrne P.M. Allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin Immunol.* 1988, 81: 119-127.

Cockcroft DW et al. Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy.* 1977. 7: 503-513.

Platts-Mills Tae et al. Bronchial hyper-reactivity and allergen exposure. *Prog. Resp. Res.* 1985. 19: 276-284.

Bellantì JA. Prevention of food-allergies. *Ann of Allergy* 1984. 53: 683-688.

Aplicaciones alimentarias

Leclercq, A. Validation of analyses methods in food microbiology. Actas de la sexta conferencia de microbiología alimentaria (*Proceedings of the sixth conference in food microbiology*), Universidad de Liège, 21 y 22 de junio de 2001.

Leclerc, V; Vincent-Race, C et al. Recherche et dénombrement de *Listeria monocytogenes*: critères microbiologiques et méthodes. Actas de la sexta conferencia de microbiología alimentaria (*Proceedings of the sixth conference in food microbiology*), Universidad de Liège, 21 y 22 de junio de 2001.

Danan, C; Cornu, M; et al. Travaux de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les tests de croissance de *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires. Actas de la sexta conferencia de microbiología alimentaria (*Proceedings of the sixth conference in food microbiology*), Universidad de Liège, 21 y 22 de junio de 2001.

Coia, J. (1998) Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 20:1-9.

Kerr, M; Fitzgerald, M. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in bottled natural mineral water *J. Appl. Microbiol.* 87; 833-841.

Smith, P; Illingworth, D.S. y Coates, D. Evaluation of the EiaFoss assay for the detection of the *Escherichia coli* O157 in food, faeces and environmental samples. Actas de la conferencia sobre "methods for Verocytotoxigenic *E. coli*" organizada por una acción concertada de la UE en VTEC (CT 98-3935) en el Western General Hospital, Edimburgo, 25-26 de noviembre de 1998, ISBN 1 84170103 3

Vernozy-Rozand, C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) in food. *J. Appl. Microb.* 82; 537-551

François, JY; Jacob, B; et al. *Salmonella spp.* detection In foods: validation study of the Transla™ plate salmonella Gold. Actas de la sexta conferencia de microbiología alimentaria (*Proceedings of the sixth conference in food microbiology*), Universidad de Liège, 21 y 22 de junio de 2001.

Van Der Zee H, Huis In't Veld JHj. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. *J AOAC Int*, 4, 934-940, 1997.

Rombouts FM et al. Rapid detection of foodborne pathogens. *Med Fac Landbouww. Univ gent* 60/4a, 1771-1776 (1995).

ES 2 295 227 T3

Paffard Sm, Miles Rj et al. A rapid and sensitive enzyme linked immunofilter assay (ELIFA) for whole bacterial cells. *Journal of Immunological methods* 192, 133-136, 1996.

5 **Bernal Cs, Robinson G et al.** Development of a sensitive and quantitative enzyme-linked immunofilter assay (ELIFA) for whole bacterial cells. *Journal of microbiological methods* 19, 135-143, 1994.

Andrews W.H. Evolution of methods for the detection of Salmonella in food. *J AOAC Int* 1, 4-12, 1996.

10 **Blackbum C.** Rapid and alternative method for the detection of Salmonella in food. *J App Bacteriol* 75, 199-215, 1993.

Feldsine, PT; Falbo-Nelson, MT et al. Visual immunoprecipitate assay (VIP) for the detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 0157:H7 in selected foods: collaborative study. *J AOAC Int*, 80, 517-529, 1997.

15 **Chapamn PA, Ellin M, Ashton R.** A comparison of immunomagnetic separation and culture Reveal and VIP for the detection of *E. coli* 0157 in enrichment cultures of naturally-contaminated raw beef, lamb and mixed meat products.

20 **Feldsine, PT; Lienau et al.** Visual immunoprecipitate assay (VIP) for the detection for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species in selected food.: collaborative study. *J AOAC Int*, 80, 517-529, 1997.

25 **Brakstad OG, Maeland JA.** Detection of staphylococcus aureus with biotinylated monoclonal antibodies directed against staphylococcal Tnase complexed to avidin-peroxidase in a rapid sandwich linked immunofiltration assay (sELIFA). *J Med Microbiol* 39, 128-134, 1993.

Dupont H, Therasse J et al. Detection of staphylococcal enterotoxin - B A comparative study of ELISA and ELIFA systems. *Journal Of Immunological methods* 128, 287-291, 1990.

30 *Medioambiente*

Schenider E, Usleber E y Martlauber E. Rapid detection of Fumonisin B-1 in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme-immunoassay, enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2548-2552, 1995.

35

Aplicaciones en ADN

40 **Aubert D, Lepan H et al.** Rapid detection of toxoplasmic nucleic-acid by enzyme-linked immunofiltration-assay after membrane transfer. *Electrophoresis*, 16, 354-356, 1995.

Aubert D, Toubas D et al. Accelerated detection of DNA on membranes by automated enzyme-linked immunofiltration assay. *Analytical Biochemistry*, 247, 25-29, 1997.

45

Material para dispositivos médicos (adaptado a material biológico)

Rubin II. Handbook of plastic materials and technology 1990. Páginas 575-589.

50 **Schouten AE. y van der Vegt.** Plastics 1987. Páginas 106-124. *Delta Press bv.* Overburg, Países Bajos.

55

60

65

ES 2 295 227 T3

Tablas

TABLA 1

Principales anticuerpos específicos y no específicos de órgano presentes en enfermedades autoinmunitarias

Clasificación general	
Anticuerpos específicos de órgano	Anticuerpos no específicos de órgano
Anti-células parietales (p. ej. enfermedad de Biermer)	Anti-músculo liso (p. ej. hepatitis activa crónica HAC tipo 1)
Anti-microsomas tiroideos (p. ej. tiroiditis de Hashimoto) tirotoxicosis de Graves	Anti-microsomas de riñón e hígado (p. ej. hepatitis activa crónica HAC tipo 2)
Anti-tiroglobulinas (p. ej. tiroiditis de Hashimoto) tirotoxicosis de Graves	Anti-mitocondria (p. ej. cirrosis biliar primaria)
Anti-islotos de Langerhans (p. ej. diabetes)	Anti-reticulina (p. ej. celiacía)
Anti-piel (p. ej. penfigoide)	Anti-endomisio (p. ej. celiacía)
Anti-músculo estriado (ej. miastenia grave)	Anti-nuclear (p. ej. enfermedades autoinmunitarias sistémicas: SLA, síndrome de Sjögren, esclerodermia, dermatomiositis, polimiositis ...)

TABLA 2

Enfermedades autoinmunitarias inducidas por autoantígenos no específicos de órgano

Enfermedades	Autoantígeno
Lupus eritematoso sistémico	ADNbc, ADNmc, RNP, Sm, cardiolipina, (SSA) (SSB)
Lupus eritematoso inducido por fármacos	Histonas
Esclerodermia	nucleolar, Scl 70
Síndrome de Crest	centrómero
Otras enfermedades reumáticas	ADNmc y/o dc
Polimiositis	Jol
Polimiositis + esclerodermia	PM-Scl
Artritis reumatoide	Inmunoglobulinas (IgG)
Enfermedades de tejido conjuntivo mixtas	RNP
Síndrome de Sjögren	SSA/SSB

ES 2 295 227 T3

TABLA 3

Enfermedades autoinmunitarias inducidas por autoantígenos específicos de órgano

5	Enfermedad	Autoantígenos no específicos de órgano
10	Enfermedad de Addison	Citoplasma de célula adrenal
15	Anemia hemolítica auto-inmunitaria	Eritrocitos
20	Hepatitis activa crónica	Lipoproteínas de la superficie celular, músculos lisos
25	Lamininas nucleares	
30	Celiaquía	Endomisio
35	Síndrome de Goodpasture	Membrana de base (glomerular y pulmonar)
40	Tirotoxicosis de Graves	Receptor de TSH
45	Tiroiditis de Hashimoto	Tiroglobulina
50	Púrpura trombocitopénica idiopática	Plaquetas
55	Diabetes de aparición juvenil	Citoplasma y superficie celular de islotes
60	Diabetes de aparición tardía	Receptor de insulina
65	Uveítis inducida por el cristalino	Cristalino
70	(Cierta) esterilidad masculina	Espermatozoides
75	Esclerosis múltiples	Cerebro
80	Miastenia grave	Músculo cardiaco y esquelético
85	Penfigoide	Membrana de base (piel)
90	Anemia perniciosa	Célula parietal, receptor de gastrina, factor intrínseco
95	Cirrosis biliar primaria	Mitocondria, piruvato deshidrogenasa
100	Mixodema primario	Tiroides
105	Oftalmia simpática	Úvea
110	Colitis ulcerosa	Lipopolisacárido del colon
115	Vasculitis	p ANCA
120	Granulomatosis de Wegener	c ANCA

ES 2 295 227 T3

TABLA 4

Evaluación del método de flujo a través descrito en la presente invención y otros métodos existentes de nefelometría y Nycomed

TABLA 4a

Método semicuantitativo

Clasificación	Ident.	Nefelometría [mg/l]	BIO ART FT [mg/l]	NYCOMED [mg/l]	Int.
1	114467	0,4	< 11 <11*	< 10	Neg.
2	114083	0,6	< 11 <11*	< 10	Neg.
3	114196	1,2	< 11 <11*	< 10	Neg.
4	114187	1,7	< 11 <11*	< 10	Neg.
5	114169	1,9	< 11 <11*	< 10	Neg.
6	114058	2,0	< 11 <11*	< 10	Neg.
7	114188	2,1	< 11 <11*	< 10	Neg.
8	114035	2,5	< 11 <11*	< 10	Neg.
9	114125	2,5	< 11 <11*	< 10	Neg.
10	114086	3,2	< 11 <11*	< 10	Neg.
11	114206	4,8	< 11 <11*	=10	Neg./D.

ES 2 295 227 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

12	114201	5,3	< 11 <11*	< 10	Neg.
13	114161	6,2	< 11 <11*	= 10	Neg./D.
14	114197	8,9	< 11 <11*	ligeramen te > 10	Neg./D.
15	114057	9,3	+/-20 +/- 15*	ligeramen te > 10	D./D.
16	114011	10,7	ligeramente > 11 = 11*	más oscuro >10 +/- 20	D./Pos.
17	114085	11,9	ligeramente > 11 < 11*	más oscuro >10 +/- 20	D./Pos.
18	114118	13,0	= 11 = 11*	25	Pos. +
19	114192	14,2	> 11 pero <27,5 > 11 pero <27,5*	25	Pos. +
20	114190	17,8	> 11 pero <27,5 > 11 pero <27,5*	25	Pos. +
21	114084	20,2	+/- 20 [11-27,5]*	ligeramen te > 25 +/- 30	Pos. +
22	114065	24,7	27,5 [11-27,5]*	25-50	Pos. +
23	114015	28,2	27,5 27,5*	25-50	Pos. ++
24	114061	31,7	27,5/27,5*	50	Pos. ++
25**	115066	34,9	+/- 69 [50- 100] [27,5-69]*	50	Pos. ++
26**	115165	38,5	+/- 69 [50- 100] +/- 40*	50	Pos. ++

ES 2 295 227 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

27	114066	43,0	+/- 69 [50-100] +/-50	más oscuro > 50 pero < 100	Pos. ++
28	115166	45,4	+/- 69 [50-100] +/-50	más oscuro > 50 pero < 100	Pos. ++
29	114081	47,7	+/- 50 +/-50	+/- 80	Pos. ++
30	115019	52,7	[27,5-69] +/-50	ligeramente < 100 +/- 90	Pos. ++(+)
31	114039	54,7	< 69 [50-100] < 69*	+/- 90	Pos. ++(+)
32	114177	60,5	< 69 [50-100] +/- 69*	+/- 100	Pos. ++(+)
33	115083	61,9	< 69 [50-100] < 69*	100	Pos. ++(+)
34*	114016	67,6	+/- 27,5 / +/- 27,5*	100	Pos. ++(+)
35**	115026	75,1	ligeramente > 91 [100-150] ligeramente < 69 *	ligeramente > 100	Pos. ++(+)
36	114068	84,0	ligeramente > 91 [100-150] = 91*	100	Pos. ++(+)
37**	114179	94,0	= 69 = 91*	ligeramente > 100	Pos. +++
38	115079	109,0	= 91 = 91*	> 100	Pos. +++
39	115022	122,0	= 91 = 91*	> 100	Pos. +++
40	114073	133,0	[91-137] = 137*	más oscuro > 100 +/- 160	Pos. +++
41	114076	157,0	[91-137] = 137*	200	Pos. ++++
42	115034	166,0	+/- 137	200	Pos.

ES 2 295 227 T3

			+/- 137*		++++
5	43*	114185	181,0	[91-137] [91-137]*	200 Pos. ++++
10	44**	115042	203,0	= 91 (punto heterogéneo) = 137*	200 Pos. ++++
15	45	114181	208,0	> 137,5 > 137,5*	200 Pos. ++++
20	46	114019	218,0	ligeramente < 275 [138-275]	> 200 sat. Pos. ++++
25	47	115016	231,0	+/- 150 +/-150*	> 200 sat. Pos. ++++
30	48	114087	258,0	+/- 150 +/-150*	> 200 sat. Pos. ++++
	49	115064	312,0	+/- 275 +/- 275*	> 200 sat. Pas. ++++
	50	115084	368,0	+/- 275 +/-275*	> 200 sat. Pos. ++++

TABLA 4b

Estudio de viabilidad de un método cuantitativo

4.b.1. Curva patrón					
Patrones mg/l	Reflectancia de filtro rojo BIO ART	Reflectancia de filtro rojo Nycomed			
275	77,2	69,9			
120	84,3	92,3			
60	95,4	112,5			
40	101,2	131,4			
20	137,0	152,1			
10	153,6	161,5			
4.b.2. Muestras					
Muestra	Nefelometria mg/l conc. anunciada	Reflectancia de filtro rojo BIO ART	Conc. mg/l	Reflectancia de filtro rojo Nycomed	Conc. mg/l
1	0,4	168,4	< 10	190,4	< 10
2	0,6	169,1	< 10	192,4	< 10
3	1,2	161,3	< 10	np	

ES 2 295 227 T3

4	1,7	171,9	< 10	190,5	< 10
5	1,9	171,3	< 10	np	
6	2,0	175,4	< 10	189,1	< 10
7	2,1	158,3	< 10	np	
8	2,5	164,2	< 10	190,2	< 10
9	2,5	150,1	< 5	np	
10	3,2	157,4	< 10	190,5	< 10
11	4,8	164,8	< 10	np	
12	5,3	162,0	< 10	186,7	< 10
13	6,2	173,8	< 10	np	
14	8,9	155,9	< 5	174,0	< 10
15	9,3	153,8	9	np	
16	10,7	155,2	< 5	170,1	10
17	11,9	151,2	11	np	
18	13,0	148,0	12	164,7	11
19	14,2	130,2	20	np	
20	17,8	140,7	15	154,3	16
21	20,2	132,9	19	np	
22	24,7	127,6	23	146,2	24
23	28,2	109,6	32	np	
24	31,7	123,6	24	140,5	28
25	34,9	110,6	33	np	
26	38,5	114,9	30	131,4	36
27	43,0	106,8	38	np	
28	45,4	99,7	40	121,9	52
29	47,7	94,7	50	np	
30	52,7	104,1	37	117,1	56
31	54,7	142,6	15?	119,9	50
32	60,5	98,2	60	114,1	64
33	61,9	101,4	52	111,2	70
34	67,6	100,8	56	113,1	68
35	75,1	98,9	60	110,2	72
36	84,0	102,3	52	103,0	92
37	94,0	94,9	78	100,4	100
38	109,0	94,6	78	87,4	160
39	122,0	97,6	64?	88,5	150

ES 2 295 227 T3

40	133,0	83,9	140	81,8	190
41	157,0	84,9	135	80,9	200
42	166,0	85,5	120	83,8	175
43	181,0	84,4	136	75,0	240
44	203,0	101,9	52 ?	74,0	260
45	208,0	83,1	150 ?	72,6	250
46	218,0	101,6	52?	68,8	300
47	231,0	99,1	54?	68,9	300
48	258,0	106,4	58?	71,6	280
49	312,0	91,3	91?	70,9	280
50	368,0	88,6	100 ?	60,5	400

TABLA 4C

Viabilidad de un método cuantitativo

Curva patrón BIO ART:

Patrón	UR
<i>mg/l</i>	
0	189
1	183
10	151
25	132
75	108
200	74

Curva:

$$y = -0,8465x + 3,0706$$

$$R^2 = 0,991$$

Curva patrón Nycomed:

Patrón	RU
<i>mg/l</i>	
0	170
10	162
40	131
60	113

ES 2 295 227 T3

120	92
275	70

Curva:

$$y = -1,2818 + 5,4987x$$

$$R^2 = 0,995$$

Muestra	Nefelometría conc. anunc. mg/l	BIO ART UR	BIO ART conc. mg/l	NYCOMED UR	NYCOMED conc. mg/l
0-5 mg/l					
1	0,4	176	2,6	190	<10
2	0,6	176	2,6	192	<10
3	1,2	178	2,1	np	
4	1,7	169	4,6	190	<10
5	1,9	164	6,3*	np	
6	2,0	173	3,4	189	<10
7	2,1	176	2,6	np	
8	2,5	180	1,6	190	<10
9	2,5	166	5,6*	np	
10	3,2	170	4,3	191	<10
11	4,8	156	9,5*	np	
5,1-10 mg/l					
12	5,3	152	11,4	187	<10
13	6,2	147	14,0	np	
14	8,9	156	9,5	174	<10
15	9,3	158	8,6	np	
10,1-25 mg/l					
16	10,7	148	13,4	170	10
17	11,9	141	17,7	np	

ES 2 295 227 T3

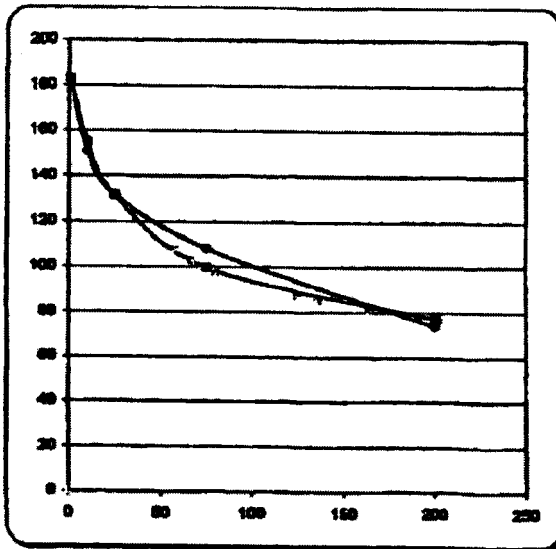
18	13,0	141	17,7	165	6,3
19	14,2	151	11,9	np	
20	17,8	133	23,6	154	17
21	20,2	133	23,6	np	
22	24,7	148	13,4	146	24,8
25,1-75					
mg/l					
23	28,2	132	24,5	np	
24	31,7	127	29,1	140	31,0
25	34,9	127	29,1	np	
26	38,5	112	48,6	131	41,3
27	43,0	131	25,3	np	
28	45,4	123	33,4	122	53,3
29	47,7	124	32,3	np	
30	52,7	112	48,6	117	60,9
31	54,7	115	43,8	np	
32	60,5	117	40,9	120	56,2
33	61,9	112	48,6	np	
34	67,6	106	59,9	113	67,6
75,1-					
200					
mg/l					
35	75,1	111	50,3	110	73,1
36	84	104	64,3	103	87,8
37	94	107	57,8	100	95,1
38	109	98	80,1	87	137,3
39**	122	103	66,6	89	129,3
40	133	112	48,6	82	161,0
41	157	85	136,2	81	166,5
42	166	81	164,3	84	150,8
43	181	77	201,9	75	207,2

ES 2 295 227 T3

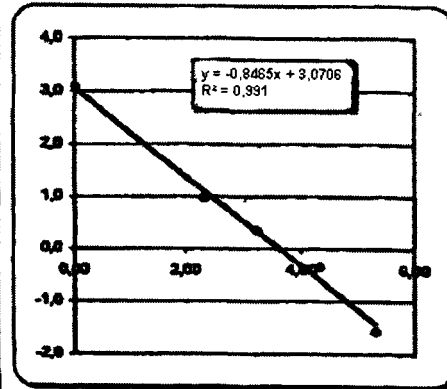
Protocolo de ensayo

estudio comparativo (tabla 4C)	
lote 1062	

Patrón (x)	Inx	Interpol.	% desv.	Curva media	Y media	Probit	Logit	Extrapol	Medida (y)
1	0,000	0	0	0	0	0	0	0	0
10	2,303	11,0	-3,3	103	88	22,107	3,089	103	103
20	3,219	24,8	-2,1	101	73	2,668	0,978	101	101
70	4,317	66,8	-20,8	108	60	1,420	0,384	101	102
200	5,298	230,4	19,7	74	42	0,718	-0,334	100	100



Medida	100
NS	00
Int. 50%	27,8
S	-0,847
InA	3,07081
Z	0,99101



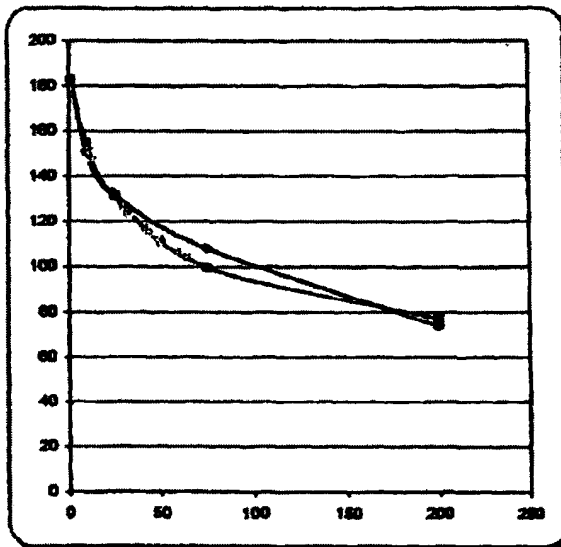
Muestra	Y	Probit	Valor
37	107	0,695	87,9
38	88	0,527	80,1
39	103	0,618	89,8
40	87	0,563	124,8
41	88	0,597	138,9
42	87	0,587	104,3
43	77	0,241	201,5
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####
0	0	-0,265	#####

ES 2 295 227 T3

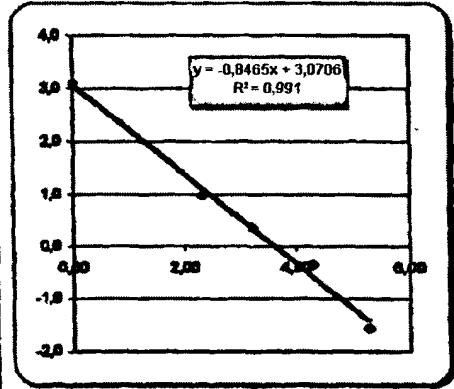
Protocolo de ensaye

estudio comparativo (tabla 4C)	
lote 1062	

Patrón (x)	lnx	Interpol.	% desv.	Curva media	Y media	Probit	Logit	Extrapol.	Medida (y)
1	0,000	0	-3,3	183	98	22,167	3,099	183	183
10	2,303	11,9	18,5	181	73	2,698	0,978	158	181
20	3,219	24,5	-2,1	132	58	1,439	0,394	131	132
75	4,317	55,8	-25,6	108	42	0,716	-0,334	100	108
200	5,298	239,4	19,7	74	17	0,209	-1,557	77	74



Medida	189
NS	89
Int. 50%	57,8
g	-0,847
lnA	3,07081
z	0,69101



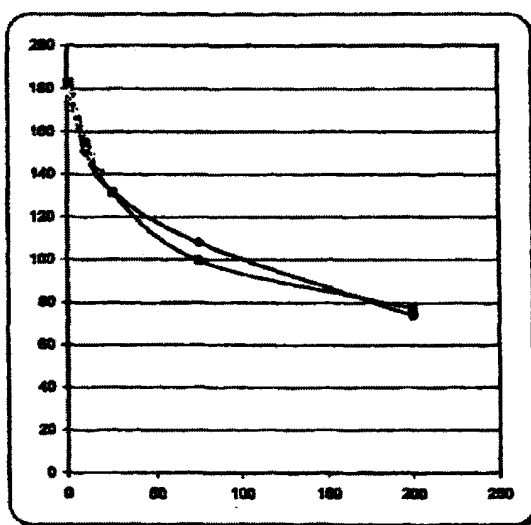
Muestra	Y	Probit	Valor
19	181	2,698	11,9
20	139	1,482	23,6
21	139	1,482	23,6
22	148	2,380	13,4
23	132	1,439	24,5
24	127	1,242	28,1
25	127	1,242	28,1
26	112	0,605	48,6
27	131	1,397	25,3
28	123	1,108	39,4
29	124	1,138	32,3
30	112	0,605	48,6
31	116	0,678	43,8
32	117	0,691	40,9
33	112	0,605	48,6
34	106	0,676	60,9
35	111	0,782	50,3
36	104	0,636	64,3

ES 2 295 227 T3

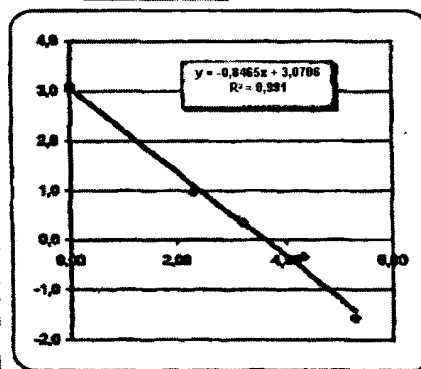
Protocolo de ensayo

estudio comparativo (tabla 4C)
lote 1062

Patrón (x)	lnx	Interpol.	% desv.	Curva media	Y media	Probit	Logit	Extrapol.	Medida (y)
1	0,000	0	0	0	-38	22,167	3,089	0	188
10	2,303	11,9	-3,3	183	66	2,638	0,978	158	181
20	3,219	24,5	-2,1	132	30	1,439	0,304	131	182
70	4,317	55,5	-28,5	105	42	0,716	-0,334	100	188
200	5,298	236,4	19,7	74	17	0,208	-1,567	77	74



Medida	180
NS	60
Int. 50%	27,8
S	-0,847
SA	3,07081
t2	0,99101



Muestra	y	Probit	Valor
1	176	8,632	2,8
2	176	9,692	2,8
3	178	11,638	2,1
4	169	5,930	4,8
5	164	4,560	8,0
6	173	7,058	3,4
7	178	8,632	2,8
8	180	14,444	1,0
9	168	5,043	5,6
10	179	8,318	4,3
11	169	3,212	9,8
12	152	2,737	11,4
13	147	2,310	14,8
14	158	3,212	9,8
15	159	3,484	9,8
16	148	2,380	13,4
17	141	1,890	17,7
18	141	1,890	17,7

ES 2 295 227 T3

TABLA 5

Evaluación de diferentes lotes de membrana

Concentración patrón mg/l	Lote de membrana 00102	Lote de membrana 00103	Lote de membrana 00106	Lote de membrana 00107
<i>dimensiones</i>	<i>8,5 cm X 17 cm</i>	<i>0,8 cm X 17 cm</i>	<i>0,8 cm X 17,5 cm</i>	<i>8,5 cm X 17 cm</i>
275	65,2	67,5	62,9	68,6
137,5	65,4	75,8	76,3	76,6
91	93,7	78,7	88,1	90,9
69	88,6	84,8	90,6	86,9
27,5	122,4	113,5	116,5	120,7
11	119,9	136,7	144,0	113,6

TABLA 6

Pruebas de diferentes lotes de membrana

Concentración mg/l	Lote de membrana 0092	Lote de membrana 0093	Lote de membrana 0094	Lote de membrana 00102	Lote de membrana 00104
<i>tiras</i>	<i>8,5 cm X 17,5 cm</i>	<i>8,5 cm X 17,5 cm</i>	<i>8,5 cm X 17,5 cm</i>	<i>8,5 cm X 17,5 cm</i>	<i>8,5 cm X 17,5 cm</i>
208	78,7	80,7	81,0	76,1	73,1
157	77,8	93,7	90,0	83,6	82,7
94	79,5	100,3	98,8	96,9	87,1
48	106,1	107,7	107,8	93,5	109,1
20	126,8	131,5	138,2	104,4/ 121,7	132,6
15	np	146,7	147,6	117,7	137,3
QC (Control de calidad)	Rechazado por QC	Aprobado por QC	Aprobado por QC	Rechazado por QC	Aprobado por QC

ES 2 295 227 T3

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

TABLA 7a

Concentración de PCR, mg/l	Lote de reflectancia 00106	Lote de reflectancia 0064	Lote de reflectancia 00111	Lote de reflectancia 00112
157	96,9	80,7	92,2	72,6
	93,9	82,8	79,2	91,2
	100,9	81,5	81,7	84,1
	109,4	80,4	89,4	84,6
<i>Media</i>	100,3	81,3	85,6	83,1
<i>Desviación estándar</i>	6,7	1,2	6,15	7,7
<i>Coefficiente de variación</i>	6,6%	1,5%	7,2%	9,3%
47,8	108,5	103,6	93,3	101,5
	122,2	104,3	101,4	98,8
	131,4	101,1	106,8	100,6
	120,9	101,0	109,4	97,1
<i>Media</i>	120,8	102,2	102,7	99,5
<i>Desviación estándar</i>	9,4	2,0	7,1	2,0
<i>Coefficiente de variación</i>	7,7%	1,9%	6,9%	2,0%
9	168,2	153,2	133,6	144,9
	156,5	154,4	139,4	152,3
	171,0	155,1	139,1	140,8
	168,5	154,5	136,4	145,7
<i>Media</i>	166,0	154,3	137,1	144,7
<i>Desviación estándar</i>	6,5	0,8	2,7	5,4
<i>Coefficiente de variación</i>	3,9%	0,5%	2,0%	3,7%

ES 2 295 227 T3

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

5

TABLA 7b

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reactivos (lote n°)					
Membrana 1062					
Conjugado 1083					
Tampón diluyente 1111 A					
TMB 1021					
Agente de fijación 1081					
muestra		UR	muestra		UR
03 (1 mg/l)		175	10 (3 mg/l)		158
		166			163
		167			167
		175			162
Media		170	Media		162
DE		4,9	DE		4
% de CV		2,8	% de CV		2,5
15 (9 mg/l)		152	21 (20 mg/l)		142
		155			128
		158			134
		165			137
Media		157	Media		134
DE		5,2	DE		5,5
% de CV		3,3	% de CV		4,1
29 (48 mg/l)		123	36 (84 mg/l)		101
		111			103
		128			102
		115			101
Media		118	Media		101
DE		6,7	DE		0,9
% de CV		5,7	% de CV		1,0
38 (109 mg/l)		100	50 (368 mg/l)		80
		95			79
		90			81
		96			77
Media		94	Media		79
DE		3,7	DE		2,1
% de CV		3,9	% de CV		2,7

ES 2 295 227 T3

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

5

TABLA7c

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reactivos (lote n°)			
Membrana 1063			
Conjugado 1083			
Tampón diluyente 1081			
TMB 1021			
Agente de fijación 1081			
Muestra	UR	Muestra	UR
02 (0,6 mg/l)	178	17 (12 mg/l)	134
	180		147
	169		146
	168		144
	170		152
	176		146
Media	174		145
DE	5,2		5,9
% de CV	2,9		4,1
22 (24,7 mg/l)	118	35 (75 mg/l)	103
	122		99
	120		105
	113		103
	125		100
	126		98
Media	121	Media	102
DE	4,6	DE	2,7
% de CV	3,8	% de CV	2,6
44 (203 mg/l)	77		
	81		
	73		
	72		
	75		
	70		
Media	75		

ES 2 295 227 T3

DE	3,9		
% de CV	5,3		

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

TABLA 7d

Reactivos			
Membrana 1062			
Conjugado 1083			
Tampón diluyente 1081			
TMB 1021			
Agente de fijación 1081			
Muestra	UR	Muestra	UR
02 (0,6 mg/l)	178	17 (12 mg/l)	134
	180		147
	169		146
	168		144
	170		152
	176		146
Media	174	Media	145
DE	5,2	DE	5,9
% de CV	2,9	% de CV	4,1
22 (24,7 mg/l)	118	35 (75 mg/l)	103
	122		99
	120		105
	113		103
	125		100
	126		98
Media	121	Media	102
DE	4,6	DE	2,7
% de CV	3,8	% de CV	2,6
44 (203 mg/l)	77		
	81		

ES 2 295 227 T3

	73		
	72		
	75		
	70		
Media	75		
DE	3,9		
% de CV	5,3		

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

TABLA 7e

Reactivos			
Membrana 1061 b			
Conjugado 1083			
Tampón diluyente 1081			
TMB 1021			
Agente de fijación 1081			
Muestra	UR	Muestra	UR
02 (0,6 mg/l)	169	17 (12 mg/l)	127
	167		132
	168		140
	165		139
	169		127
	170		140
Media	168		134
DE	2,1		6,8
% de CV	1,2		4,7
22 (32 mg/l)	111	35 (75 mg/l)	99
	110		95
	112		98
	113		100
	112		98
	111		100

ES 2 295 227 T3

Media	111	Media	98
DE	0,8	DE	1,9
% de CV	0,7	% de CV	1,9
44 (203 mg/l)	84		
	80		
	80		
	85		
	88		
	81		
Media	83		
DE	3,2		
% de CV	3,9		

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

TABLA 7f

Reactivos			
Membrana 1066			
Conjugado 1083			
Tampón diluyente 1081			
TMB 1021			
Agente de fijación 1081			
Muestra	UR	Muestra	UR
02 (0,6 mg/l)	176	17 (12 mg/l)	139
	166		132
	164		138
	163		130
Media	167	Media	135
DE	6,0	DE	4,4
% de CV	3,6	% de CV	3,3
21 (20 mg/l)	119	36 (84 mg/l)	93
	119		101
	114		96

ES 2 295 227 T3

	114		96
Media	116	Media	96
DE	2,9	DE	3,3
% de CV	2,5	% de CV	3,4
50 (368 mg/l)	75		
	77		
	83		
	86		
Media	80		
DE	5,1		
% de CV	6,3		

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

TABLA 7g

Reactivos			
Membrana 1071			
Conjugado 1083			
Tampón diluyente 1081			
TMB 1021			
Agente de fijación 1081			
Muestra	UR	Muestra	UR
02 (0,6 mg/l)	171	17 (12 mg/l)	125
	174		139
	178		132
	167		132
Media	172	Media	132
DE	4,7	DE	5,7
% de CV	2,7	% de CV	4,3
21 (20 mg/l)	111	36 (84 mg/l)	85
	117		100
	106		79
	107		89

ES 2 295 227 T3

Media	110	Media	88
DE	5,0	DE	8,8
% de CV	4,5	% de CV	10,0
50 (368 mg/l)	67		
	73		
	63		
	67		
Media	68		
DE	4,1		
% de CV	6,1		

TABLA 7

Evaluación de la reproducibilidad dentro de un ensayo

TABLA 7h

Reactivos			
Membrana 1062			
Conjugado 1083			
Tampón diluyente 1113			
TMB 1021			
Agente de fijación 1081			
muestra	UR	muestra	UR
03 (1,2 mg/l)	182	10 (3,2 mg/l)	165
	182		164
	177		172
	178		165
Media	180		167
DE	2,6		3,7
% de CV	1,5		2,2
21 (20 mg/l)	123	29 (48 mg/l)	110
	136		103
	143		108
	130		97
Media	132	Media	104,5

ES 2 295 227 T3

DE	9,7	DE	5,8
% de CV	7,4	% de CV	5,5
36 (84 mg/l)	89	38 (109 mg/l)	89
	95		93
	94		81
	101		82
Media	95	Media	86
DE	4,9	DE	5,7
% de CV	5,2	% de CV	6,7

TABLA 8

Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos

TABLA 8a

Conc. patrón mg/l							Media	DE	% de CV
Lote	00106	00106	00111	00112	00114	00111			
275	62,9	58,4	68,7	68,2	75,4	70,1	67,3	5,9	8,7
137,5	76,3	75,7	73,0	78,2	82,6	77,8	77,3	3,2	4,1
91	88,1	78,8	85,6	89,2	84,6	80,0	84,4	4,2	5,0
69	90,6	89,6	99,5	95,1	93,6	86,6	92,5	4,6	4,9
27,5	116,5	102,4	115,3	108,6	112,9	102,4	109,7	6,2	5,7
11	114,1	123,2	137,1	130,9	134,9	122,9	127,2	8,7	6,8

TABLA 8b

Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos

Reactivos
 Membrana 1062
 Conjugado 1083
 Tampón diluyente 1081 y 1111A
 TMB 1021
 Agente de fijación 1081

Muestra	UR	Patrón	UR
02 (0,6 mg/l)	174	1 mg/l	173
	178		172
	174		172

ES 2 295 227 T3

	176		182
Media	176	Media	175
DE	2	DE	4,9
% de CV	1,1	% de CV	2,8
17 (12 mg/l)	137	10 mg/l	147
	150		154
	147		141
	141		150
Media	144	Media	148
DE	5,8	DE	5,5
% de CV	4,1	% de CV	3,7
22 (24,7 mg/l)	118	25 mg/l	125
	113		135
	120		121
	/		131
Media	117	Media	128
DE	3,6	DE	6,2
% de CV	3,1	% de CV	4,9
35 (75 mg/l)	106	75 mg/l	104
	104		103
	101		97
	111		108
Media	106	Media	103
DE	4,2	DE	4,5
% de CV	4,0	% de CV	4,4
44 (203 mg/l)	76	200 mg/l	89
	78		90
	74		74
	85		73

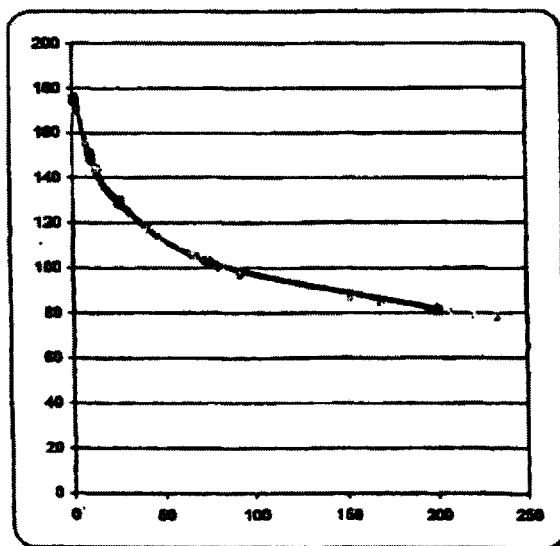
ES 2 295 227 T3

Media	78	Media	82
DE	4,8	DE	9,2
% de CV	6,2	% de CV	11,3
		Blanco	180
			181
			181
			181
		Media	181
		DE	0,5
		% de CV	0,3

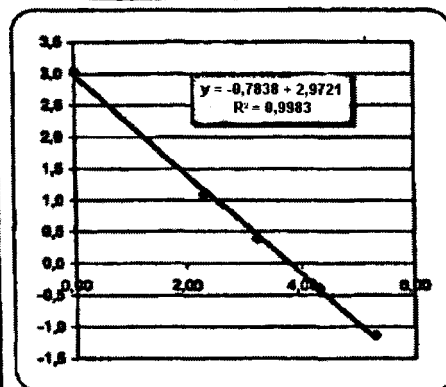
Protocolo de ensayo

entre ensayos tabla 8d
curva patrón lote 1062

Patrón (x)	lnx	Interpol.	% desv.	Curva media	Y media	Probit	Logit	Extrapol.	Medida (y)
1	0,000	0	0	0	-38	20,833	3,037	0	178
10	2,303	0,9	-7,9	178	85	2,970	1,088	150	148
25	3,219	11,1	10,6	148	75	1,472	0,388	130	128
75	4,317	72,8	-3,2	128	40	0,879	-0,388	102	100
200	5,298	187,3	-5,4	82	24	0,323	-1,129	81	82



Medida	181
NS	85
Int. 50%	44,3
S	-6,788
lnA	2,97213
r2	0,99827



ES 2 295 227 T3

TABLA 8c

Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos

5

Reactivos
Membrana 1063
Conjugado 1083
Tampón diluyente 1081 y 1111A
TMB 1021
Agente de fijación 1081

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Muestra	UR	Patrón	UR
02 (0,6 mg/l)	169	1 mg/l	176
	170		170
	173		169
	173		174
Media	171	Media	173
DE	2,1	DE	3,3
% de CV	1,2	% de CV	1,9
17 (12 mg/l)	132	10 mg/l	141
	143		135
	141		153
	Np		141
Media	139	Media	143
DE	5,9	DE	7,5
% de CV	4,2	% de CV	5,3
22 (24,7 mg/l)	113	25 mg/l	137
	122		121
	122		115
	118		124
Media	119	Media	124
DE	4,3	DE	9,3
% de CV	3,6	% de CV	7,5

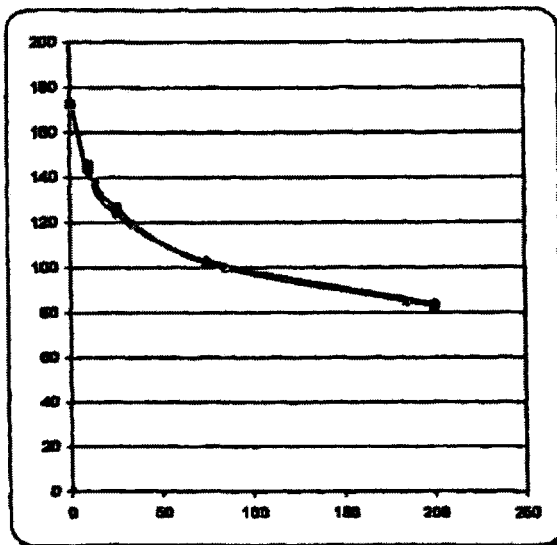
ES 2 295 227 T3

	35 (75 mg/l)	94	75 mg/l	110
5		111		100
		101		98
		91		104
10	Media	99	Media	103
	DE	8,9	DE	5,3
	% de CV	8,9	% de CV	5,1
15				
	44 (203 mg/l)	75	200 mg/l	91
20		96		87
		83		80
		82		79
25	Media	84	Media	84
	DE	8,8	DE	5,7
	% de CV	10,4	% de CV	6,8
30				
			Blanco	183
35				179

Protocolo de ensayo

entre ensayos tabla 8c
curva patron lote 1083

Patrón (x)	lnx	Interpol.	% desv.	Curva media	Y media	Probit	Logit	Extrapol.	Medida (y)
1	0,000	0	-0,9	173	83	13,067	2,616	172	173
10	2,303	11,3	13,1	143	70	2,385	0,589	145	143
30	3,219	28,0	12,0	124	58	1,276	0,244	127	124
70	4,317	71,1	-8,2	103	40	0,871	-0,388	102	103
200	5,298	164,8	-7,8	84	26	0,547	-1,029	83	84



Medida	192
NS	60
Int. 50%	39,3
B	-0,639
lnA	2,54268
r2	0,99711

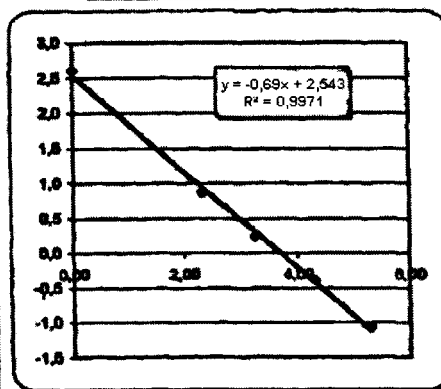


TABLA 8d

Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos

Reactivos
 Membrana 1066
 Conjugado: 1083 y 1081
 Tampón diluyente: 1081 y 1111A
 TMB: 1021
 Agente de fijación: 1081

Patrón	UR
200 mg/l	83
	76
	81
	95

ES 2 295 227 T3

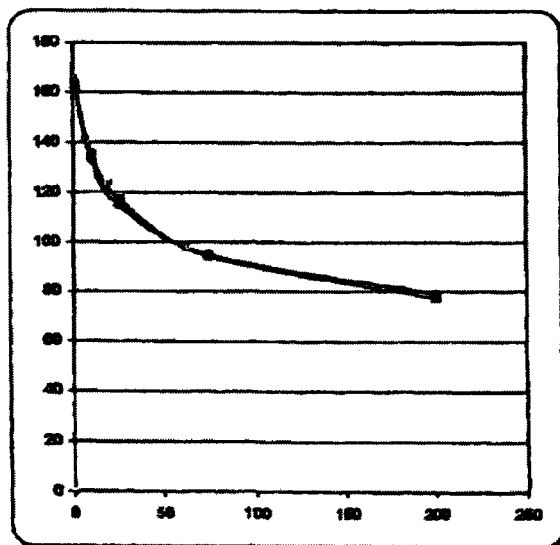
	78
	74
5	67
	Media
	79
10	DE
	8,1
	% de CV
	10,2
	75 mg/l
15	
	104
	93
	92
	104
20	
	95
	92
	87
25	
	Media
	95
	DE
	6,4
30	
	% de CV
	6,4
	25 mg/l
	125
	119
35	
	109
	126
	110
40	
	110
	108
45	
	Media
	115
	DE
	7,9
	% de CV
50	
	6,8
	10 mg/l
	130
	130
	127
55	
	131
	135
	132
60	
	148
	Media
65	
	133

ES 2 295 227 T3

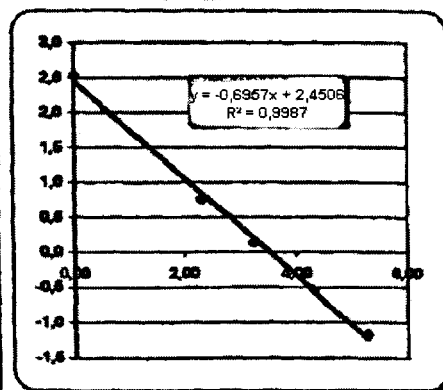
DE	6,9
% de CV	5,2
1 mg/l	159
	160
	162
	168
	161
	167
	163
Media	163
DE	3,4
% de CV	2,1

Protocolo de ensayo	reproducibilidad (tabla 8d)
	lote 1066

Patrón (x)	lnx	Interpol.	% desv.	Curva media	Y media	Probit	Logit	Extrapol.	Medida (x)
1	0,000	0	0	0	-41			0	165
10	2,303	11,4	-10,8	163	93	12,538	2,530	162	163
20	3,219	20,0	11,9	138	68	2,128	0,785	135	118
70	4,317	73,1	-2,8	118	53	1,140	0,131	117	86
200	5,298	168,1	-8,8	78	24	0,312	-1,185	77	78



Medida	172
NS	86
Int. 50%	23,8
S	-8,698
SA	2,45064
Z	0,9987



ES 2 295 227 T3

TABLA 8e

Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Reactivos	
Membrana 1066	
Conjugado: 1083 y 1081	
Tampón diluyente: 1081 y 1111A	
TMB : 1021	
Agente de fijación : 1081	
muestra	UR
44 (203 mg/l)	76
	70
	72
	80
	78
Media	75
DE	4,1
% de CV	5,5
35 (75 mg/l)	102
	90
	91
	101
	104
Media	98
DE	6,6
% de CV	6,7
22 (24,7 mg/l)	118
	115
	120
	129
	132
Media	123
DE	7,3
% de CV	6,0

ES 2 295 227 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

17 (12 mg/l)	133
	129
	133
	154
	157
Media	141
DE	13,1
% de CV	9,3
2 (0,6 mg/l)	162
	162
	169
	171
	166
Media	166
DE	4,0
% de CV	2,4

TABLA 8f

Evaluación de la reproducibilidad entre ensayos

Reactivos
 Membrana 1065
 Conjugado 1083
 Tampón diluyente 1081 y 1111A
 TMB 1021
 Agente de fijación 1081

Muestra	UR	Patrón	UR
02 (0,6 mg/l)	173	1 mg/l	164
	172		164
	175		171
	175		177
Media	174	Media	169
DE	1,5	DE	6,3
% de CV	0,9	% de CV	3,7

ES 2 295 227 T3

5	17 (12 mg/l)	155	10 mg/l	147
		145		148
		149		140
		136		143
10	Media	146	Media	145
	DE	8,0	DE	3,7
	% de CV	5,5	% de CV	2,6
15				
20	22 (24,7 mg/l)	115	25 mg/l	110
		119		136
		121		119
25		124		119
	Media	120	Media	121
	DE	3,8	DE	10,8
30	% de CV	3,2	% de CV	8,9
35	35 (75 mg/l)	92	75 mg/l	98
		84		98
		97		92
40		88		106
	Media	90	Media	99
	DE	5,6	DE	5,7
45	% de CV	6,2	% de CV	5,8
50	44 (203 mg/l)	87	200 mg/l	84
		75		84
		80		83
55		81		87
	Media	81	Media	85
	DE	4,9	DE	1,7
60	% de CV	6,1	% de CV	2,0

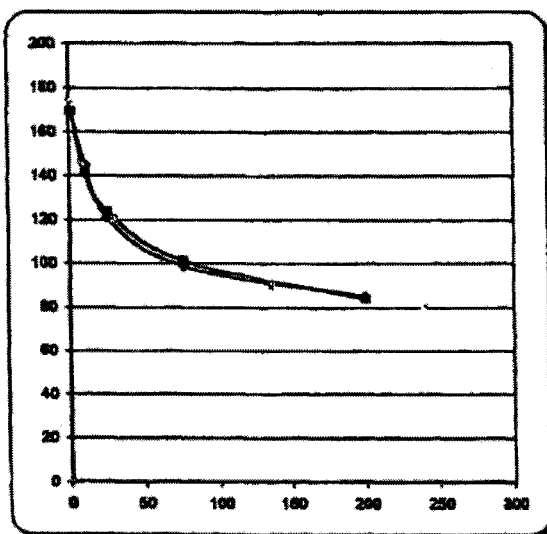
65

ES 2 295 227 T3

Protocolo de ensayo

entre ensayos tabla 8f
curva patrón lote 1065

Patrón (x)	lnx	Interpol.	% desv.	Curva media	Y media	Probit	Logit	Extrapol.	Medida (y)
1	0,000	0	0	0	36	0,154	2,214	0	169
10	2,303	1,1	5,3	169	80	2,588	0,943	169	148
25	3,219	2,0	19,7	145	72	1,164	0,152	124	121
78	4,317	28,5	13,8	121	54	0,580	-0,627	101	99
290	5,298	84,2	12,3	99	37	0,391	-1,019	84	85
		186,0	-7,5	85	27				



Medida	192
NS	89
Int. 50%	38,3
S	-0,628
lnA	2,24843
Z	0,89478

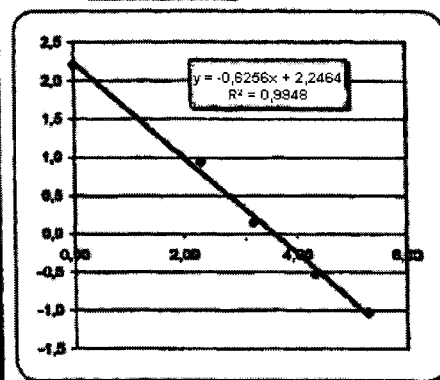


TABLA 9

Evaluación de diferentes agentes de TMB

TABLA 9a

Evaluación de diferente agentes de TMB (objetivo 1)

Concentración de PCR mg/l	Reflectancia con TMB "A"	Reflectancia con TMB "B"
275	77,2	59,0
137,5	84,3	67,5
91	95,4	73,9
69	101,2	89,0
27,5	136,9	105,2
11	153,6	123,8

ES 2 295 227 T3

TABLA 9b

Evaluación de 2 lotes diferentes de TMB (objetivo 2)

5	Reactivos			
	Membrana 1051			
	Conjugado 1051			
10	Tampón diluyente 1051			
	Agente de fijación 1021			
15	<i>Patrón</i>	<i>Lote de TMB 207 (ref.)</i>	<i>Lote de TMB 629</i>	<i>% ref.</i>
20	mg /l	UR	UR	Razón 207/629
	100	91	87	95,6
25	50	103	118	114,5
	10	144	141	97,9
	5	148	149	100,6
30	+ ctrl Nycomed	137	121	88,3
	+ muestra dil. 1/200	114	127	111,4
35				Media: 101,4 +1,04%

TABLA 9c

Evaluación de 2 lotes diferentes de TMB en muestras

45	Reactivos			
	Membrana 1065			
	Conjugado 1083			
	Tampón diluyente 111A			
50	Agente de fijación 1081			
55	<i>Muestras</i>	<i>Lote de TMB 629 (ref)</i>	<i>Lote de TMB 917</i>	<i>Diferencia %.</i>
60		UR	UR	
	29 (48 mg/l)	113	125	
		127	117	
65		113	132	
	<i>media</i>	118	125	5,4%

ES 2 295 227 T3

	<i>Desv. estándar</i>	8,0	7,5	
	<i>% de CV</i>	6,9	6,0	
5				
	50 (368 mg/l)	58	58	
10		76	62	
		70	70	
	<i>media</i>	69	63	9,5%
15	<i>Desv. estándar</i>	10	6,1	
	<i>% de CV</i>	14,6	9,6	
20				
	<i>Blanco (0 mg/l)</i>	185	176	
		178	175	
25		179	175	
	<i>media</i>	181	175	3,4%
	<i>Desv. estándar</i>	3,8	0,6	
30	<i>% de CV</i>	2,1	0,3	
			Media	6,1%

TABLA 10

Determinación del límite de detección inferior

TABLA 10a

45	Reactivos (lote n°)	
	Membrana 1061 b	
	Conjugado 1083	
50	Tampón diluyente 1111	
	TMB 1021	
	Agente de fijación 1081	
55		
	Concentración patrón	UR
60	0 mg/l	184
		191
		181
		189
65	<i>media</i>	186,25

ES 2 295 227 T3

	Desv. estándar (DE)	4,57
	% de CV	2,45
5	1,5 DE	6,85
	Media +/- 1,5 DE	179,4 - 193,1
	2 DE	9,4
10	Media +/- 2 DE	176,9 - 195,7
15	1 mg/l	160
		162
		172
20		159
	media	163,25
	Desv. estándar (DE)	5,97
25	% de CV	3,65
	1,5 DE	8,94
30	Media +/- 1,5 DE	154,3 - 172,2
	2 DE	11,9
	Media +/- 2 DE	151,4 - 175,5
35	10 mg/l	143
		138
40		133
		144
	media	139,5
45	Desv. estándar (DE)	5,1
	% de CV	3,6
	1,5 DE	7,6
50	Media +/- 1,5 DE	131,9 - 147,1
	2 DE	10,1
55	Media +/- 2 DE	129,4 - 149,6

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 295 227 T3

TABLA 10b

Determinación del límite de detección inferior

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Reactivos (lote n°)	
Membrana 1106	
Conjugado 1083	
Tampón diluyente 1081	
TMB 1021	
Agente de fijación 1081	
Concentración patrón	UR
0 mg/l	178
	183
media	180,5
Desv. estándar (DE)	3,53
% de CV	1,95
1,5 DE	5,3
Media +/- 1,5 DE	175,2 - 185,8
2 DE	7,1
Media +/- 2 DE	173,4 - 187,6
1 mg/l	169
	173
media	171,0
Desv. estándar (DE)	2,82
% de CV	1,6
1,5 DE	4,2
Media +/- 1,5 DE	166,8 - 175,2
2 DE	5,6
Media +/- 2 DE	165,4 - 176,6
10 mg/l	145
	136
media	140,05
Desv. estándar (DE)	6,4
% de CV	4,5

ES 2 295 227 T3

1,5 DE	9,5
Media +/- 1,5 DE	131,0 - 150,0
2 DE	12,7
Media +/- 2 DE	127,8 - 153,2

TABLA 10c

Determinación del límite de detección inferior

Reactivos (lote n°)	
Membrana 1071	
Conjugado 1083	
Tampón diluyente 1081	
TMB 1021	
Agente de fijación 1081	
Concentración patrón	UR
0 mg/l	171
	177
media	174
Desv. estándar (DE)	4,2
% de CV	2,4
1,5 DE	6,4
Media +/- 1,5 DE	167,6 - 180,4
2 DE	8,4
Media +/- 2 DE	165,6 - 182,4
1 mg/l	169
	171
media	170
Desv. estándar (DE)	1,4
% de CV	0,8
1,5 DE	2,1
Media +/- 1,5 DE	167,9 - 172,1
2 DE	2,8
Media +/- 2 DE	167,2 - 172,8

ES 2 295 227 T3

10 mg/l	143
	142
media	142,5
Desv. estándar (DE)	0,7
% de CV	0,5
1,5 DE	1,1
Media +/- 1,5 DE	141,4 - 143,6
2 DE	1,4
Media +/- 2 DE	141,1 - 143,9

TABLA 11

Detección de anticuerpos anti-mitocondriales tipo M2

TABLA 11a

1ª comparación con el método EUSA

<i>Reactivos</i>				
Membrana: 1082				
Conjugado: 1051				
Tampón diluyente: 1081				
Agente de fijación: 1021				
Muestra n°	FT (UR)	Int.	ELISA (DO 450 nm)	Int.
<i>positiva</i>				
34590	135	+	1,836	+
4820	128	+	1,905	+
26416	90	+	1,567	+
18133	119	+	1,481	+
8413	121	+	1,800	+
5276	90	+	1,510	+
<i>negativa</i>				
49319	161	-	0,206	-
49556	154	-	0,178	-
3494	158	-	0,064	-

ES 2 295 227 T3

2364	149	-	0,049	-
49435	164	-	0,036	-
40855	147	-	0,075	-
3494	161	-	0,049	-
2364	154	-	0,064	-
46235	156	-	0,040	-
Limite	143	-	<0,300	
Valor blanco	164			

TABLA 11b

Detección de anticuerpos anti-mitocondriales tipo M2

Estudio de la reproducibilidad entre ensayos				
<i>Reactivos</i>				
Membrana: 1081 / 1082 / 1083/ 1085				
Conjugado: 1051				
Tampón diluyente: 1081				
Agente de fijación: 1021				
Muestra positiva	UR	UR	UR	UR
Membrana de lote	1081	1082	1083	1085
5276	90	80	np	80
		89		
		90		
Media	86			
Desv. estándar	5,3			
% de CV	6,2			
26416	89	106	95	82
	90			
Media	92			
Desv. estándar	8,9			
% de CV	9,6			

ES 2 295 227 T3

	18133	119	104	109	98
5	<i>Media</i>	107			
	<i>Desv. estándar</i>	7,7			
10	<i>% de CV</i>	7,2			
	Muestras negativas	UR	UR	UR	
15	<i>Membrana de lote</i>	1081	1082	1083	
20	3494	161	152	167	
	<i>Media</i>	160			
25	<i>Desv. estándar</i>	7,5			
	<i>% de CV</i>	4,7			
30	2364	153	159	148	
	<i>Media</i>	153			
	<i>Desv. estándar</i>	5,5			
35	<i>% de CV</i>	3,6			
40	49435	153	140	153	
	<i>Media</i>	149			
	<i>Desv. estándar</i>	7,5			
45	<i>% de CV</i>	5,0			

TABLA 12

Detección de Salmonella

Viabilidad de la cuantificación			
Factor de dilución	Recuento de bacterias/ml	Unidades de reflectancia	Unidades de reflectancia
		a) Volúmenes 2 x 250 µl	b) Volumen 1 x 500 µl
10-1	$5,30 \times 10^7$	92	25
10-2	$5,0 \times 10^8$	67	

ES 2 295 227 T3

10-3	$5,80 \times 10^5$	np	
10-4	$6,3 \times 10^4$	106	50
10-5	$5,6 \times 10^3$	107	
10-6	$5,9 \times 10^2$	np	
10-7	$6,5 \times 10^1$	np	
10-8	7,0	np	96
blanco		170	170

TABLA 13

Influencia de la composición del tampón diluyente

Muestra	Tampón 1111 (A)	Tampón 1112 (A)	Tampón 1051 (B)	Tampón 1113 (C)
	UR	UR	UR	UR
3 (1,2 mg/l)	175	171	172	182
	166	175	177	182
	167	165	174	177
	74	169	170	178
Media	170	170	176	180
Desv. estándar	4,9	4,2	3,0	2,6
% de CV	2,8	2,4	1,7	1,5
15 (9,3 mg/l)	152	151	157	157
	155	162	157	161
	159	153	152	160
	165	154	160	150
Media	158	155	157	157
Desv. estándar	5,6	4,8	3,3	5,0
% de CV	3,6	3,1	2,1	3,2
21 (20 mg/l)	142	137	119	123
	128	142	137	136
	133	141	141	143
	137	136	122	130
Media	135	139	130	132

ES 2 295 227 T3

Desv. estándar	5,9	2,9	10,8	9,7
% de CV	4,4	2,1	8,4	7,4
36 (84 mg/l)	101	103	102	89
	103	115	108	95
	102	117	99	94
	101	112	112	101
Media	102	112	105	95
Desv. estándar	0,9	6,2	5,9	4,9
% de CV	0,9	5,5	5,6	5,2
50 (268 mg/l)	80	68	71	74
	79	70	91	69
	81	74	85	71
	77	71	80	65
Media	79	71	82	70
Desv. estándar	1,7	2,5	8,5	3,8
% de CV	2,2	3,5	10,3	5,4

TABLA 14

Correlación con otro método rápido para la detección de PCR mediante inmunoturbidimetría

TABLA 14a

Correlación en muestras negativas

Número de muestras	BIO ART conc. mg/l	ORION conc. mg/l
12	0-9	< 8
15	10	< 8
3	10-25	< 8

TABLA 14b

Correlación en muestras bajo positivo (conc. desde 9 hasta 26 mg/l)

1. Muestra n°	2. BIO ART conc. mg/l	3. ORION conc. mg/l	4. Correlación
5. 5	6. 25	7. 19	8. Ok
9. 7	10. 10	11. 9	12. Ok

ES 2 295 227 T3

13. 10	14. 25	15. 16	16. Ok
17. 11	18. 25	19. 19	20. Ok
21.13	22.10	23. 12	24. Ok
25. 21	26. 10-25	27. 11	28. Ok
29. 22	30. 10-25	31. 26	32. Ok
33. 26	34. 25	35. 15	36. Ok
37. 30	38. 10-25	39. 13	40. Ok
41. 31	42. 25-50	43. 25	44. Ok
45. 33	46. 25	47. 10	48. Ok
49. 42	50. 10	51. 18	52. Ok

TABLA 14c

Correlación en muestras positivas entre 27 y 100 mg/l

Muestra n°	BIO ART conc. mg/l	Orion conc. mg/l	Correlación
14	75-100	77	ok
15	25-50	27	ok
18	25-50	50	ok
40	50	44	ok

TABLA 14d

Muestra n°	BIO ART conc. mg/l	Orion conc. mg/l
37	200	112

TABLA 14e

Conclusión general

ORION*

	Resultados +	Resultados -
BIO ART		
Resultados +	17	3
Resultados -	0	27
Total	17	30
Sensibilidad:	17/17	Especificidad: 27/30
	100%	90%

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al recopilar las referencias, no pueden descartarse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 0207152 A [0006]
- US 5958790 A [0006] [0010] [0013]
- US 5616467 A [0006]
- EP 0458231 A [0008] [0013] [0013]
- EP 0125118 A [0009] [0013]

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

• **KOHLER, F.; MILSTEIN, C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1995, vol. 256, 495-497 [0036]

• **MERRIFIELD, B.** Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.*, 1997, vol. 289, 3-13 [0056]

• **LEMOINE F.M.** Intérêts clinique de la recherche des auto-anticorps. *Medical trends*, 1992, vol. 6

• Centro Hospitalario de Luxemburgo. **HUMBEL RL.** *Cources related to auto-immunity*. Universidad de Lieja, 1990 [0245]

• **ABUAF N.; JOHANET C.; HOMBERG JC.** Les autoanticorps anti-tissus non spécifiques d'organe. 2e journée d'immunopathologie de l'hôpital Rothschild *OPTION BIO* n°51 [0245]

• **STURGESS, A.** Recently characterised autoantibodies and their clinical significance *Aust NZ J Med*, 1992, vol. 22, 279-289 [0245]

• **MC NEIL HP; KRILIS SA.** Antiphospholipid antibodies *Aust Nz J Med*, 1991, vol. 21, 463-475 [0245]

• **DE ROOIJ et al.** Use of recombinant RNP peptides 70K and A in an ELISA for measurement of antibodies in mixed connective tissue disease: a longitudinal follow up of 18 patients. *Ann Rheum Dis*, 1990, vol. 49, 391-395 [0245]

• **WHITTIGHAM S. et al.** Serological diagnosis of primary Sjögren syndrome by means of recombinant La (SSB) as nuclear antigen. *Lancet*, 1987, vol. 8549, 1-3 [0245]

• **MATHEWS MB; BERNSTEIN RM.** Myositis autoantibody inhibits histidyl tRNA synthetase. A model for autoimmunity. *Nature*, 1983, vol. 304, 177-179 [0245]

• **LE ROY et al.** Scleroderma (systemic sclerosis); classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.*, 1988, vol. 15, 202-205 [0245]

• **TAN et al.** Anti-nuclear antibodies (ANA's): diagnostically specific immune markers and clues towards the understanding of systemic auto-immunity. *Clin Immunol Immunopath.*, 1988, vol. 47, 121-141 [0245]

• Antinuclear antibodies: diagnostic markers for auto-Immune diseases and probes for cell biology. **TAN ENG.** *Advances in Immunology. Academic Press*, 1989, vol. 44, 93-151 [0245]

• **HOCHBERG MC et al.** Systemic Lupus Erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine*, 1985, vol. 64, 285-295

• **LINDBACK S et al.** The value of C-reactive protein as a marker of bacterial infection in patients with septicaemia, endocarditis and influenza. *Scand J Infect Dis*, 1989, vol. 21, 543-9 [0246]

• **MORLEY J; KUSHNER I.** Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann NY Acad Sci*, 1982, vol. 389, 406-18 [0246]

ES 2 295 227 T3

- **WHICHER J et al.** Acute phase response of serum amyloid A protein and C-reactive protein to the common cold and influenza. *J Clin Pathol*, 1985, vol. 38, 312-6 [0246]
- **PEPYS M; BALTZ M.** Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol*, 1983, vol. 34, 141-212 [0246]
- **CHAMBERS RE et al.** Acute phase protein in inflammatory disease. *Lab*, 1988, vol. 1, 29-37 [0246]
- **MC CABE RE; REMINGTON JS.** C-reactive protein in patients with bacteremia. *J Clin Microbiol*, 1984, vol. 20, 317-9 [0246]
- **MACKIE et al.** C-reactive protein for rapid diagnosis of infection in leukaemia. *J Clin Pathol*, 1979, vol. 32, 1253-6 [0246]
- **ANGERMAN N et al.** C-reactive protein in the evaluation of antibiotic therapy for pelvic infections. *J Reprod Med*, 1980, vol. 25, 65-7 [0246]
- **PHILIPS A; ANDREWS P.** Rapid determination of C-reactive protein levels; semi-quantitative versus quantitative. *J. Paediatrics*, 1987, vol. 110, 263-8 [0246]
- **KOMORSKI et al.** Quantitative measurement of C-reactive protein in acute otitis media. *Clin Lab Observ*, 1987, vol. 111, 81-4 [0246]
- **CLAUS DR et al.** Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera. *J Lab Clin Med*, 1976, vol. 87, 120-8 [0246]
- **GRÜTZEIMER S; VON SCHENK H.** Four immunochemical methods for measuring C-reactive protein in plasma compared. *Clin Chem*, 1989, vol. 35, 461-3 [0246]
- **WADSWORTH C; WADSWORTH E.** Efficacy of latex agglutination and quantification methods for determination of C-reactive protein in pediatric sera. *Clin Chem Acta*, 1984, vol. 138, 309-18 [0246]
- **COLLET-CASSART D et al.** A quantitative C-reactive protein assay using latex agglutination in microtiter plates. *J Immunol Methods*, 1989, vol. 125, 137-41 [0246]
- **HULMAN G et al.** An accurate, simple and rapid test for detecting elevated levels of C-reactive protein in serum by agglutination of fat emulsion. *Clin Chim Acta*, 1986, vol. 156, 337-40 [0246]
- **PRICE CP et al.** Development and validation of a particle enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein. *J Immunol Methods*, 1987, vol. 99, 205-11 [0246]
- **HIGHTON J; HESSIAN P.** A solid-phase enzyme immunoassay for C-reactive protein: clinical value and the effect of rheumatoid factor. *J Immunol Methods*, 1984, vol. 68, 185-92 [0246]
- **KÄPYAHO K.** Rapid determination of C-reactive protein by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies. *Scand J Clin Lab Invest*, 1989, vol. 49, 389-93 [0246]
- **BUITAGO MG et al.** Clinical evaluation of a fluorescence polarization immunoassay for quantifying C-reactive protein (Tech Brief. *Clin Chem*, 1988, vol. 34, 595-6 [0246]
- **HJORTDAHL P et al.** C-reactive protein: a new rapid assay for managing infectious disease in primary health care. *Scand J Prim Health Care*, 1991, vol. 8, 20-6 [0246]
- **URDAL P et al.** Rapid immunometric measurement of C-reactive protein in whole blood. *Clin Chem*, 1992, vol. 38, 580-4 [0246]
- Autoantibody patterns in Primary Biliary Cirrhosis. P.A. **BERG**; R. **KLEIN**. Auto-immune liver diseases. *Raven Press*, 1991, 121-142 [0247]
- **BERG E.L.; R. KLEIN.** Antimitochondrial antibodies in primary Biliary Cirrhosis and other disorders: definition and clinical relevance. *Dig. Dis.*, 1992, vol. 10, 857-907 [0247]
- **BAMPTON et al.** Measurement of Rheumatoid factors by an enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with other methods. *Annals of Rheumatic Diseases*, 1985, vol. 44, 13-19 [0248]
- **STONE R. et al.** Clinical value of ELISA assays for IgM and IgG Rheumatic factors. *J. Clin. Pathol*, 1987, vol. 40, 107-111 [0248]

ES 2 295 227 T3

- **KUBY**. *J. Immunology*. W.H. Freeman and Company, 1992 [0249]
- **MYGIND** N. *Essential Allergy*. *Blackwell Scientific Publications*, 1986 [0249]
- 5 • **Dodet** Allergy: une cascade de reactions. *BIOFUTUR*, julio de 1989 [0249]
- **DAVID** B. Allergenes et desensibilisation. *Rev. Fr. Allergol.*, 1989, vol. 26, 29-37 [0249]
- **O'BYRNE** P.M. Allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin Immunol.*, 1988, vol. 81, 119-
10 127 [0249]
- **COCKCROFT** DW *et al.* Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy*, 1977,
vol. 7, 503-513 [0249]
- 15 • **PLATTS-MILLS** TAE *et al.* Bronchial hyper-reactivity and allergen exposure. *Prog. Resp. Res.*, 1985, vol. 19,
276-284 [0249]
- **BELLANTI** JA. Prevention of food-allergies. *Ann of Allergy*, 1984, vol. 53, 683-688 [0249]
- 20 • Validation of analyses methods in food microbiology. **LECLERCQ**, A. *Proceedings of the sixth conference in
food microbiology*. Universidad de Lieja, 21 de junio de 2001 [0250]
- Recherche et dénombrement de *Listeria monocytogenes*: critères microbiologiques et méthodes. **LECLERC**, V;
VINCENT-RACE, C *et al.* *Proceedings of the sixth conference in food microbiology*. Universidad de Lieja, 21 de
25 junio de 2001 [0250]
- Travaux de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les tests de croissance de *Listeria monocy-*
togenes dans les denrées alimentaires. **DANAN**, C; **CORNU**, M *et al.* *Proceedings of the sixth conference in food
microbiology*. Universidad de Lieja, 21 de junio de 2001 [0250]
- 30 • **COIA**, J. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Im-*
munology and Medical Microbiology, 1998, vol. 20, 1-9 [0250]
- **KERR**, M.; **FITZGERALD**, M. *et al.* Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in bottled natural mineral water *J.*
35 *Appl. Microbiol.*, vol. 87, 833-841 [0250]
- **SMITH**, P.; **ILLINGWORTH**, D.S.; **COATES**, D. Evaluation of the EiaFoss assay for the detection of the
Escherichia coli O157 in food, faeces and environmental samples. Conference proceedings on "methods for Verocy-
totoxicogenic *E. coli*" organised by an EU concerted Action on VTEC (CT 98-3935. Western General Hospital, 25 de
40 noviembre de 1998 [0250]
- **VERNOZY-ROZAND**. C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin producing *E. coli*
(VTEC) in food. *J. Appl. Microb.*, vol. 82, 537-551 [0250]
- 45 • *Salmonella spp.* detection In foods: validation study of the Transla™ plate salmonella Gold. **FRANÇOIS**, JY;
JACOB, B *et al.* *Proceedings of the sixth conference in food microbiology*. Universidad de Lieja, 21 de junio de 2001
[0250]
- **VAN DER ZEE** H; **HUIS IN'T VELD** JHJ. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis.
50 *J AOAC Int*, 1997, vol. 4, 934-940 [0250]
- **ROMBOUTS** FM *et al.* Rapid detection of foodborne pathogens. *Med Fac Landbouww*, 1995, 1771-1776
- **PAFFARD** SM; **MILES** RJ *et al.* A rapid and sensitive enzyme linked immunofilter assay (ELIFA) for whole
55 bacterial cells. *Journal of Immunological methods*, 1996, vol. 192, 133-136 [0250]
- **BERNAL** CS; **ROBINSON** G *et al.* Development of a sensitive and quantitative enzyme-linked immunofilter
assay (ELIFA) for whole bacterial cells. *Journal of microbiological methods*, 1994, vol. 19, 135-143 [0250]
- 60 • **ANDREWS** W.H. Evolution of methods for the detection of Salmonella in food. *J AOAC Int* 1, 1996, 4-12
- **BLACKBUM** C. Rapid and alternative method for the detection of Salmonella in food. **J App Bacteriol**, 1993,
vol. 75, 199-215 [0250]
- 65 • **FELDSLNE**, PT; **FALBO-NELSON**, MT *et al.* Visual immunoprecipitate assay (VIP) for the detection of
enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (EHEC) O157:H7 in selected foods: collaborative study. *J AOAC Int*, 1997, vol.
80, 517-529 [0250]

ES 2 295 227 T3

- **CHAPAMN PA; ELLIN M; ASHTON R.** A comparison of immunomagnetic separation and culture Reveal and VIP for the detection of *E.coli* 0157 in enrichment cultures of naturally-contaminated raw beef, lamb and mixed meat products [0250]
- 5 • **FELDSINE, PT; LIENAU et al.** Visual immunoprecipitate assay (VIP) for the detection for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species in selected food.: collaborative study. *J AOAC Int*, 1997, vol. 80, 517-529 [0250]
- 10 • **BRAKSTAD OG; MAELAND JA.** Detection of staphylococcus aureus with biotinylated monoclonal antibodies directed against staphylococcal Tnase complexed to avidin-peroxidase in a rapid sandwich linked immunofiltration assay (sELIFA). *J Med Microbiol*, 1993, vol. 39, 128-134 [0250]
- **DUPONT H; THERASSE J et al.** Detection of staphylococcal enterotoxin - B A comparative study of ELISA and ELIFA systems. *Journal Of Immunological methods*, 1990, vol. 128, 287-291 [0250]
- 15 • **SCHENIDER E; USLEBER E; MARTLAUBER E.** Rapid detection of Fumonisin B-1 in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme-immunoassay, enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. *Journal of Agricultural and FoodChemistry*, 1995, vol. 43, 2548-2552 [0251]
- 20 • **AUBERT D; LEPAN H et al.** Rapid detection of toxoplasmic nucleic-acid by enzyme-linked immunofiltration-assay after membrane transfer. *Electrophoresis*, 1995, vol. 16, 354-356 [0252]
- **AUBERT D; TOUBAS D et al.** Accelerated detection of DNA on membranes by automated enzyme-linked immunofiltration assay. *Analytical Biochemistry*, 1997, vol. 247, 25-29 [0252]
- 25 • **RUBIN II.** Handbook of plastic materials and technology, 1990, 575-589 [0253]
- **SCHOUTEN AE.; VAN DER VEGT.** *Plastics. Delta Press*, 1987, 106-124 [0253]

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para recubrir un material poroso insoluble con un compuesto o complejo de unión a analito, que comprende las etapas de:

- a) sumergir dicho material en una disolución que comprende dicho compuesto o complejo de unión a analito,
- b) sumergir dicho material en una disolución de bloqueo,
- 10 c) secar el material poroso,

en el que dichas etapas se realizan en ausencia de cualquier lavado intermedio.

15 2. Método para someter a prueba la presencia de, o para cuantificar, un analito en una muestra, que comprende las etapas de:

- a) recubrir un material poroso insoluble según el método de la reivindicación 1,
- 20 b) preparar un dispositivo de múltiples capas que comprende el material poroso de la etapa a),
- c) aplicar la muestra sobre el dispositivo de la etapa b), en el que el (primer) compuesto de unión a analito o complejo de unión a analito se une al analito presente en dicha muestra,
- 25 d) formar una estructura intercalada, en la que dicho analito se une a un segundo compuesto de unión a analito marcado enzimáticamente o complejo de unión a analito marcado enzimáticamente,
- e) generar un depósito coloreado tras el contacto con un sustrato precipitante adecuado para dicho marcador enzimático en un procedimiento de una etapa, y,
- 30 f) añadir una disolución de fijación para detener la reacción enzimática y permitir la retención permanente del color resultante.

3. Método según la reivindicación 2, en el que la muestra se aplica en la etapa c) a dicha zona de prueba.

35 4. Método según la reivindicación 2, en el que las etapas c) a f) se realizan en ausencia de etapas de lavado intermedias.

40 5. Método según la reivindicación 2, en el que dicho marcador enzimático es HRP y dicho sustrato precipitante se elige del grupo que consiste en TMB (tetrametilbencidina) o AEC (3-amino-9-etilcarbazol).

6. Método según la reivindicación 2, en el que dicho marcador enzimático es fosfatasa alcalina y dicho sustrato se elige del grupo que consiste en BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo) o BCIP-NBT (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo-azul de nitrotetrazolio).

45 7. Método según la reivindicación 2, en el que dicho marcador enzimático es una deshidrogenasa y dicho sustrato es NBT (azul de nitrotetrazolio).

50 8. Método según la reivindicación 5, en el que el precipitado de TMB formado puede fijarse usando un reactivo elegido del grupo que consiste en poli(alcohol vinílico) complementado con sulfosuccinato de dioctilo o dimetilformamida.

55 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, mediante el cual se aplican volúmenes de 5 a 500 microlitros para inducir una mancha coloreada homogénea cuando está presente un orificio de 3-4 mm de diámetro en la capa de cubierta de dicho dispositivo.

10. Método según la reivindicación 9, en el que se añade del 1% al 40% de sacarosa a la muestra cuando la zona de prueba es superior a 4 mm o si el volumen de muestra es superior a 100 microlitros.

60 11. Método según las reivindicaciones 9 ó 10 en el que una zona, limitada por el orificio, tiene un diámetro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 mm y en el que el volumen de muestra es de 5 a 2000 microlitros.

65 12. Método según la reivindicación 2, en el que se controlan, se someten a prueba y/o se determinan muestras de agua o de alimentos.

13. Método según la reivindicación 2, en el que se detectan y/o se identifican patógenos de origen alimentario.

ES 2 295 227 T3

14. Método según la reivindicación 2, usado para detectar un marcador de enfermedad autoinmunitaria, marcador de enfermedad infecciosa, alérgeno, marcador de enfermedad cardíaca, marcador de inflamación o marcador de infección bacteriana.

5 15. Método según la reivindicación 2, aplicado al diagnóstico y/o la monitorización del tratamiento de enfermedades.

10 16. Método según la reivindicación 15, en el que dichas enfermedades incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, alérgenos, enfermedades cardíacas, inflamación e infecciones bacterianas.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la disolución de bloqueo contiene el 0,2-10% de agente de bloqueo.

15 18. Método según la reivindicación 17, en el que el agente de bloqueo es BSA.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65