(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 366 050**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06836818 .2**
(96) Fecha de presentación : **02.11.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1943519**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

(54) Título: **Métodos para la determinación de la avidez de anticuerpos IgG.**

(30) Prioridad: **02.11.2005 US 265481**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2011

(73) Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Department D377/Ap6A-1 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-6008, US

(72) Inventor/es: **Maine, Gregory T.;**
Hsu, Stephen C.;
Smith, Jr., Darwin D.;
Pucci, Dominick L.;
Herzogenrath, Jörg;
Curdt, Ingo y
Christ, Heike Maria

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 366 050 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

Métodos para la Determinación de la Avidez de Anticuerpos IgG

Antecedentes de la Invención

Campo Técnico

La presente invención se refiere a métodos para la determinación de la avidez de anticuerpos IgG anti-agentes infecciosos, por ejemplo, la avidez del anticuerpo IgG anti-citomegalovirus humano y anti-toxoplasma humano.

Información Antecedente

El Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que se clasifica entre los Coccidios. Este parásito tiene una gama de anfitriones relativamente amplia infectando tanto mamíferos como aves. El organismo es ubicuo en la naturaleza y existe en tres formas: taquizoitos, quistes, y ooquistes (Remington, J.S., McLeod, R., Desmonds, G., Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant (J.S. Remington y J.O. Klein, Eds.), págs. 140-267, Saunders, Filadelfia (1995)). Los taquizoitos encontrados durante la infección aguda, son la forma invasiva capaz de invadir todas las células de mamífero nucleadas. Después de la fase aguda de la infección, se forman los quistes tisulares llamados bradizoitos dentro de las células del anfitrión y persisten dentro del organismo del anfitrión durante la vida del anfitrión. Los quistes son importantes en la transmisión de la infección, especialmente en seres humanos, ya que la ingestión de carne cruda o poco cocinada puede dar como resultado la ingestión de bradizoitos, que pueden infectar al individuo dando como resultado una infección aguda. Los ooquistes representan una fase de la reproducción sexual, que se produce solamente en el revestimiento intestinal de la familia de los gatos desde el cual son excretados en las heces.

La infección por T. gondii adquirida a través de carne contaminada o heces de gato en un adulto sano es a menudo asintomática. En mujeres embarazadas y en pacientes inmunodeprimidos, el resultado clínico puede ser muy grave. Una infección aguda con T. gondii adquirida durante el embarazo, especialmente durante el primer trimestre, puede dar como resultado la transmisión intrauterina al feto nonato produciendo graves complicaciones fetales y neonatales, incluyendo retraso mental y muerte fetal. El recrudecimiento de una infección por T. gondii previa o una infección aguda en un individuo inmunodeprimido puede resultar patogénica. La encefalitis toxoplásmica es la principal causa de morbidez y mortalidad en pacientes con SIDA. También se ha demostrado que la infección por Toxoplasma es una causa significativa de coriorretinitis en niños y adultos.

La diagnosis de la infección con T. gondii se puede establecer por medio del aislamiento de T. gondii de la sangre o los fluidos corporales, demostración de la presencia del organismo en la placenta o tejidos del feto, demostración de la presencia del antígeno mediante detección de secuencias de ácido nucleico específicas (p. ej., sondas de ADN), o detección de inmunoglobulinas específicas de T. gondii sintetizadas por el anfitrión en respuesta a una infección utilizando ensayos serológicos.

La detección de anticuerpos específicos de T. gondii y la determinación del título de anticuerpos son herramientas importantes utilizadas en la diagnosis de la toxoplasmosis. Las pruebas serológicas más ampliamente utilizadas para la diagnosis de la toxoplasmosis son la prueba del colorante de Sabin-Feldman (Sabin, A.B. y Feldman, H.A. (1948) Science 108, 660-663), la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA) (Jacobs, L. y Lunde, M. (1957) J. Parasitol. 43, 308-314), la prueba de IFA (Walton, B.C. et al. (1966) Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 149-152), la prueba de aglutinación (Fondation Mérieux, Serologie de l'Infection Toxoplasmique en Particulier à Son Début: Méthodes et Interprétation des Resultants, Lyon, 182 págs. (1975)) y el ELISA (Naot, Y. y Remington, J.S. (1980) J. Infect. Dis. 142, 757-766). La prueba de ELISA es una de las pruebas más fáciles de realizar, y se encuentran disponibles en el mercado muchas pruebas serológicas automáticas para la detección de IgM e IgG específicas de Toxoplasma.

Las pruebas actuales para la detección de los anticuerpos IgM e IgG en individuos afectados pueden variar ampliamente en cuanto a su capacidad para detectar anticuerpos en el suero. Por consiguiente, existe una variación significativa entre análisis entre los kits disponibles en el mercado. Las diferencias observadas entre los diferentes kits comerciales están causadas principalmente por la preparación del antígeno utilizado para la prueba serológica. La mayor parte de los kits utilizan taquizoitos o bien enteros o bien sometidos a sonicación desarrollados en cultivos de tejidos o en ratones, que contienen una elevada razón de material extra-parasítico, por ejemplo, células de mamífero, componentes para el cultivo de tejidos, etc. Debido a la carencia de un antígeno normalizado, purificado o de un método convencional para preparar el antígeno de taquizoitos, no es sorprendente que exista variabilidad entre análisis que dé como resultado análisis con diferentes características de funcionamiento en términos de sensibilidad y especificidad del análisis.

Dadas las limitaciones de las pruebas serológicas que emplean el antígeno de taquizoitos, como se ha descrito antes, así como los problemas persistentes referentes a la determinación del comienzo de la infección, los antígenos

recombinantes purificados obtenidos por medio de la biología molecular son una alternativa atractiva ya que pueden ser purificados y normalizados. En la literatura, han sido clonados numerosos genes de Toxoplasma y expresados en un anfitrión adecuado para producir antígenos de Toxoplasma recombinantes, inmunorreactivos. Por ejemplo, P22 (SAG2), P24 (GRA1), P25, P28 (GRA2), P29 (GRA7), P30 (SAG1), P35 (GRA 8), P41 (GRA4), P54 (ROP2), P66 (ROP1) de Toxoplasma, y los antígenos P68 de Toxoplasma han sido descritos (Prince et al. (1990) Mol. Biochem. Parasitol 43, 97-106; Cesbron-Delauw et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 7537-7541; Johnson et al. (1991) Gene 99, 127-132; Prince et al. (1989) Mol. Biochem. Parasitol. 34, 3-13; Bonhomme et al. (1998) J. Histochem. Cytochem. 46, 1411-1421; Burg et al. (1988) J. Immunol. 141, 3584-3591; Knapp et al. (1989) EPA 431541A2; Carey et al. (2000) Molec. Biochem. Parasitol. 105, 25-37; Mevelec et al. (1992) Mol. Biochem. Parasitol. 56, 227-238; Saavedra et al. (1991) J. Immunol. 147, 1975-1982); EPA 751 147).

Adicionalmente, se debe observar que la presencia de anticuerpos IgG en una única muestra de suero es suficiente para establecer que el paciente ha sido infectado pero no proporciona una indicación en cuanto a cuándo se produjo la infección. No obstante, en los Estados Unidos, no existe un programa de escrutinio serológico sistemático en mujeres embarazadas, mientras en países tales como Francia y Austria, se obtienen sueros a intervalos regulares a lo largo de la gestación en mujeres que son seronegativas cuando se someten al ensayo por primera vez. En los Estados Unidos, la decisión referente a si la mujer estuvo infectada recientemente, poniendo de ese modo en riesgo su feto, a menudo se toma a partir de los resultados de una única muestra de suero. No obstante, es crítico en las mujeres embarazadas determinar tan exactamente como sea posible si adquirieron su infección inmediatamente antes o durante el embarazo. Por esta razón, la presencia de anticuerpos IgG en una mujer embarazada a menudo conduce a una prueba serológica adicional para intentar determinar si la infección fue adquirida durante el embarazo o en un pasado lejano (Remington et al., 1995, Toxoplasmosis, 4ª ed., Coord. Ed., Remington, J.S., W.B. Saunders, Filadelfia, PA). De las pruebas serológicas adicionales recomendadas, aquellas que demuestran la presencia de anticuerpos IgM son las más frecuentemente utilizadas. No obstante, puesto que los anticuerpos IgM pueden seguir siendo detectables durante más de un año después de la infección inicial, la manifestación de estos anticuerpos no se puede utilizar para probar una infección recientemente adquirida (Liesenfeld et al., Journal of Clinical Microbiology 35:174-78 (1997); Wilson et al., Journal of Clinical Microbiology 35:3112-15 (1997); Wong et al., Clinical Infectious Diseases 18:853-62 (1994)). Debido a que la diagnosis exacta de la infección recientemente adquirida en mujeres embarazadas es importante para la gestión clínica tanto de la madre como de su feto, ha continuado la búsqueda de mejores métodos de diagnóstico (Remington et al., 1995, Toxoplasmosis, 4ª ed., Coord. Ed., J.S. Remington, W.B. Saunders, Filadelfia, PA; Wong et al., supra).

El citomegalovirus humano (HCMV) es un miembro del grupo de herpes virus, es un agente ubicuo, y es responsable de un amplio espectro de enfermedades que afectan a los seres humanos en mucho entorno clínicos diferentes. Es raramente patógeno en adultos sanos pero está asociado con diferentes enfermedades en individuos inmunocomprometidos (tales como personas afectadas por el VIH y receptores de transplantes). Además, el HCMV es la causa más común de infección congénita, produciéndose en aproximadamente un 1% de todos los nacimientos vivos (Britt, W.J. y Alford, C.A. (1996) Cytomegalovirus, In Fields Virology, 3ª ed., Fields et al. (eds.), Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, PA, 2493-2523; Stagno, S. (1995) Cytomegalovirus. En Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant (4ª ed.) Remington, J.S. y Klein, J.O. (eds.), W.B. Saunders, Filadelfia, PA, 312-353). Puesto que las infecciones por HCMV en mujeres embarazadas son asintomáticas o están acompañadas por síntomas no específicos, se utilizan métodos de laboratorio que incluyen serología y virología para diagnosticar la infección por HCMV.

La diagnosis de la infección por HCMV se puede obtener mediante la manifestación directa del virus en los diferentes fluidos corporales o indirectamente por medio de serología. Con el fin de que el médico evalúe exactamente el riesgo de un embarazo potencialmente complicado por la infección materna con el HCMV, es importante distinguir entre infección por HCMV primaria y no primaria. La transmisión intrauterina de la infección por HCMV primaria (aprox. 40%) en el primer trimestre del embarazo tiene el potencial de ocasionar una lesión fetal significativa, incluyendo la muerte fetal (Boppana, S. et al. (1992) Pediatr. Infect. Dis. J. 11, 93-99). La transmisión intrauterina de la infección por HCMV no primaria se produce a un ritmo mucho menor (aprox. 0,2-1%) y generalmente, pero no siempre, es asintomática en el recién nacido en desarrollo (Boppana, S. et al. (1999) Pediatr. 104, 55-60).

La diagnosis de la infección por HCMV primaria en pacientes se confirma si se detecta la seroconversión en los anticuerpos IgG e IgM específicos de HCMV. Sin embargo, puesto que en la actualidad no se encuentran disponibles opciones de tratamiento para la infección por HCMV primaria en mujeres embarazadas, la seroconversión en anticuerpos específicos de HCMV se detecta raramente como pre-gestacional, y las mujeres embarazadas no son escrutadas rutinariamente en busca de anticuerpos para HCMV. La detección de IgM específica para HCMV ha sido utilizada como marcador de una infección por HCMV activa o reciente (Nielsen, S.L. (1988) J. Clin. Microbiol. 26, 654-661) y su detección varía ampliamente con un escaso consenso entre las pruebas comerciales (Lazzarotto, T. et al. (1992) J. Clin. Lab. Anal. 6, 216-218). Desafortunadamente, la IgM específica de HCMV se puede producir durante las infecciones por HCMV tanto primarias como no primarias, y por lo tanto esta

prueba solamente sirve como un marcador para indicar embarazos en riesgo de una potencial infección por HCMV congénita que requiere unas pruebas clínicas y un seguimiento adicionales.

Las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos IgM específicos de Toxoplasma y anticuerpos IgM específicos de HCMV en mujeres embarazadas sirven como marcadores para embarazos con riesgo de infección congénita. Sin embargo, estas pruebas no pueden discriminar entre una toxoplasmosis aguda y una crónica o una infección por HCMV primaria o no primaria, respectivamente. Puesto que una toxoplasmosis materna aguda o una infección por HCMV primaria durante el primer trimestre poseen un elevado riesgo de daño fetal, se requieren pruebas adicionales para evaluar más exactamente el riesgo y el potencial impacto que la infección materna tiene sobre el desarrollo del feto y el recién nacido. En particular, se necesita una prueba que pueda ayudar a la determinación de si la infección materna fue adquirida durante el embarazo o si la infección se produjo en un pasado lejano, esto es, antes de la concepción. Si la infección se produjo antes de la concepción, la inmunidad materna sería suficiente para proteger al feto en desarrollo en el útero y no se requerirían pruebas adicionales ni intervención. Por otra parte, si la infección se produjo durante la gestación, se proporcionaría a las mujeres embarazadas consultoría obstétrica y en el caso de sospecha de toxoplasmosis aguda, se podría comenzar una intervención terapéutica para intentar evitar la transmisión intrauterina del parásito.

Se sabe que la afinidad de unión funcional o la avidez de los anticuerpos IgG aumentan progresivamente con el tiempo después de la inmunización de los animales, también conocida como maduración de la repuesta inmunitaria humoral (Inouye at al. (1984) J. Clin. Microbiol. 20, 525-529). Los análisis de afinidad convencionales, por ejemplo, la diálisis de equilibrio utilizando el análisis de Scatchard, no son adecuados para la medida de las respuestas policlonales logradas por antígenos microbianos, virales y parasíticos grandes y complejos (Hedman, K. y Rousseau, S.A. (1989) J. Virol. 27, 288-292). Se han utilizado análisis de unión competitiva para evaluar la afinidad del anticuerpo después de la vacunación y la inmunidad protectora materna a la infección congénita por VIH (Devey, M.E. et al. (1988) J. Immunol. Methods 106, 119-125; Devash, Y. et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87, 3445-3449). No obstante, no se han descrito análisis de unión competitiva que discriminen entre una infección aguda y una infección adquirida en el pasado lejano.

Adicionalmente, está bien establecido que los análisis de avidez de IgG que utilizan reactivos caotrópicos se pueden utilizar a nivel diagnóstico para discriminar entre una infección aguda (anticuerpos IgG de baja avidez predominantemente presentes) y una infección adquirida en el pasado lejano (anticuerpos IgG de elevada avidez predominantemente presentes) para una variedad de agentes infecciosos incluyendo HCMV (Bodéus, M. et al. (1998) Clin. Diagn. Virol. 9,9-16), T. gondii (Lappalainen, M. et al. (1993) J. Infect. Dis. 167, 691-697), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Suligoi, B. et al. (2002) J. Clin. Microbiol. 40, 4015-4020), Parvovirus B19 (Gray, J.J. et al. (1993) J. Virol. Meth. 44,11-23), Herpesvirus 6 y 7 (Ward, K.N. et al. (2001) J. Clin. Microbiol. 39,959-963), virus de la Hepatitis A, B, C, E (Roque-Afonso, A.-M. et al. (2004) J. Clin. Microbiol. 42, 5121-5124; Thomas, H.I.J. (1997) J. Med. Virol. 51,189-197; Ward, K.N. et al. (1994) J. Med. Virol. 43, 367-372; Zhang, J.-Z. et al. (2002) J. Med. Virol. 66,40-48), virus de Epstein-Barr (EBV) (Weissbrich, B. (1998) J. Med. Virol. 54,145-153), Actinobacillus actinomycetemcomitans (periodontitis juvenil) (O'Dell, D.S. et al. (1995) Clin. Exp. Immunol. 101,295-301), Virus Herpes Simplex de Tipo 2 (Ashley, R. et al. (2004) Sexual. Transmitt. Dis. 31,508-515), Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SRAS) (Chan, P.K.S. et al. (2005) J. Infect. Dis. 192,166-169), Fascioliasis (trematodos del hígado) (Abou-Basha, L.M. et al. (2000) East. Mediterr. Health J. 6,919-925), Virus de la Encefalitis Portado por Garrapatas (VEPG) (Gassman, C.G. y Bauer, G. (1997) J. Med. Virol. 51, 242-251), la Rubéola (Hedman, K. y Rousseau, S.A. (1989) J. Med. Virol. 27,288-292), la borreliosis de Lyme (Rauer, S. et al. (2001) Scand. J. Infect. Dis. 33,809-811), el virus Varicella Zoster (VVZ) (Erika, O. (2004) Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 46,165-168), el virus del Dengue (Fick, de Souza V.A.U. et al. (2004) J. Clin. Microbiol. 42,1782-1784), la Esquistosomiasis (trematodos de la sangre) (J. Egypt. Soc. Parasitol. 32,979-985), Porphyromonas gingivalis (periodontitis) (Benjamin, P.A. et al. (1997) J. Period. Res. 32,31-39), Aspergillus umbrosus (enfermedad pulmonar de los granjeros) (Clin. Exp. Immunol. 95,162-165), el virus Puumala (Hedman, K. et al. (1991) Lancet 338,1353-1356), y la Brucellosis (Gutierrez, J. et al. (1995) Revista Medica de Chile 123,819-822). Los análisis de avidez de IgG "caseros" y comerciales actuales emplean el uso de reactivos caotrópicos (p. ej., urea, dietilamina, tiocianato, guanidio, etc.) para distinguir entre los anticuerpos de avidez alta y baja (véanse la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.3.72.426B1; Hedman, K. y Seppala, I. (1988) J. Clin. Immunol. 8, 214-221; Hedman et al. (1989) J. Infect. Dis. 4, 736-740; Thomas, H.I.J. y Morgan-Capner, P. (1988) Epidem. Inf. 101, 591-598; Thomas, H.I.J. y Morgan-Capner, P. (1991) J. Virol. Methods 31, 219-228; Montoya, J.G. et al. (2002) J. Clin. Microbiol. 40, 2504-2508; Pfrepper, K. I. et al. (2005) Clin. Diagn. Labora. Immunol. 12, 977-982; Petersen, E. et al. (2005) J. Clin. Microbiol. 43, 1570-1574; Baccard-Longere, M. et al. Clin. Diagn. Labora. Immunol. 8, 429-431). El reactivo caotrópico puede ser añadido a la muestra del paciente para inhibir la unión de los anticuerpos de baja avidez al "antígeno en fase sólida" durante la incubación con el "antígeno en fase sólida". Como alternativa, el agente caotrópico se puede utilizar para lavar el "antígeno en fase sólida" después de la incubación de la muestra del paciente con el "antígeno en fase sólida". Los anticuerpos IgG de baja avidez se separan del "antígeno en fase sólida" por medio del reactivo caotrópico. La razón de la señal en el análisis de avidez se determina con un producto conjugado anti-IgG humana que contiene un compuesto generador de señal en presencia y en ausencia del reactivo caotrópico (añadido a la muestra o utilizado para lavar el "antígeno en fase sólida") y es proporcional al nivel de IgG de alta avidez presente en la muestra del

paciente. No obstante, los reactivos caotrópicos pueden ser peligrosos o corrosivos para la plataforma del aparato automatizado y también puede presentar contaminación cruzada con otros análisis ocasionando de ese modo resultados aberrantes. Por consiguiente, existe una necesidad actual y significativa de un inmunoanálisis de avidez de IgG automatizado que no utilice reactivos caotrópicos.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención incluye un método para la determinación de la razón de anticuerpo IgG de baja avidez anti-agente infeccioso humano en un paciente que se sospecha que está infectado por el agente infeccioso. Este método comprende las etapas de: a) añadir al menos un antígeno aislado del agente infeccioso a una disolución para crear un antígeno en fase líquida y recubrir el al menos un antígeno aislado sobre una fase sólida para crear un antígeno en fase sólida; b) en un primer análisis, poner en contacto una muestra de ensayo del paciente con una fase líquida que no comprende un antígeno infeccioso y después con la fase sólida recubierta de la etapa a) durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de alta y baja avidez a dicha fase sólida; c) lavar la fase sólida recubierta de la etapa b); d) en un segundo análisis, poner en contacto una muestra de ensayo del paciente con el antígeno en fase líquida, esto es el antígeno en disolución y después con el antígeno en fase sólida durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de baja avidez a dicha fase sólida; e) lavar el antígeno en fase sólida puesto en contacto de la etapa d); f) añadir un producto conjugado al primer y segundo análisis durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anti-IgG/anticuerpo/antígeno en el primer y segundo análisis, donde el producto conjugado comprende un anticuerpo anti-IgG anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; g) detectar una señal generada por el compuesto generador de señal en el primer y segundo análisis; h) determinar la razón entre la señal obtenida en el segundo análisis y la señal obtenida en el primer análisis, donde la razón representa la proporción del anticuerpo IgG de baja avidez anti-agente infeccioso humano presente en la muestra del paciente; e i) multiplicar dicha razón de la etapa h) por 100 y restar dicha razón multiplicada de 100 para determinar el Índice de avidez. El agente infeccioso puede ser, por ejemplo, un virus, un parásito, un hongo o una bacteria. Adicionalmente, la muestra del paciente puede ser tratada previamente con disolución antes de la adición de la fase sólida recubierta. Asimismo la fase sólida puede ser, por ejemplo, un material poroso, un material no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula, una cuenta, una membrana, un pocillo de microtitulación o un tubo de plástico. En una realización la presente invención incluye un método para la determinación de la proporción de anticuerpo IgG de baja avidez anti-toxoplasma humano en un paciente. Este método comprende las etapas de: a) añadir al menos un antígeno aislado de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) a una disolución (p. ej., diluyente) para crear un antígeno en fase líquida y recubrir con el al menos un antígeno aislado una fase sólida para crear un antígeno en fase sólida; b) en un primer análisis, poner en contacto una muestra de ensayo del paciente con una fase líquida *que no comprenda antígenos de T. gondii* y después con la fase sólida recubierta de la etapa a) durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de alta y baja avidez a dicha fase sólida; c) lavar la fase sólida recubierta de la etapa b); d) en un segundo análisis, poner en contacto una muestra de ensayo de paciente con el antígeno en fase líquida, esto es el antígeno en disolución y después con el antígeno en fase sólida durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de baja avidez a dicha fase sólida; e) lavar el antígeno en fase sólida contactado de la etapa d); f) añadir un producto conjugado al primer y segundo análisis durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anti-IgG/anticuerpo/antígeno en el primer y segundo análisis, donde el producto conjugado comprende un anticuerpo anti-IgG anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; g) detectar una señal generada por el compuesto generador de señal en el primer y segundo análisis; h) determinar la razón entre la señal obtenida en el segundo análisis y la señal obtenida en el primer análisis, donde la razón representa la proporción de anticuerpo IgG de baja avidez anti-Toxoplasmosis humano presente en la muestra del paciente; e i) multiplicar la razón de la etapa h) por 100 y restar la razón multiplicada de 100 con el fin de determinar el Índice de avidez. En una realización relacionada, un Índice de avidez < 30% indica que el paciente tiene IgG para Toxoplasma de baja avidez, un Índice de avidez ≥ 40% indica que el paciente tiene IgG para Toxoplasma de elevada avidez, y un Índice de avidez de 30% a 39% indica que el paciente tiene una avidez equívoca para el anticuerpo IgG para Toxoplasma. Como alternativa, un Índice de avidez < 20% indica que dicho paciente tiene IgG para Toxoplasma de baja avidez, un Índice de avidez ≥ 50% indica que dicho paciente tiene IgG para Toxoplasma de alta avidez, y un Índice de avidez de 20% a 49% indica que dicho paciente tiene una avidez equívoca del anticuerpo IgG para Toxoplasma. (Un resultado "equívoco" es aquel que es incierto y necesita tomar otra muestra del paciente (p. ej., 2-3 semanas después de la primera prueba) y someterlo a ensayo utilizando los métodos descritos en la presente memoria. No es un resultado de IgG de baja o alta avidez. Adicionalmente, un resultado "equívoco" también puede ser referido como un resultado "dudoso", "zona gris", "medio" o "moderado".) Un resultado de IgG para Toxoplasma de baja avidez indica que el paciente puede tener o no toxoplasmosis aguda, y un resultado de IgG para Toxoplasma de alta avidez indica que el paciente no ha tenido toxoplasmosis aguda en los aproximadamente 4 meses previos a la prueba.

El "al menos un antígeno aislado" del método puede ser, por ejemplo, P22, P24, P25, P28, P29, P30, P35, P41, P54,

P66 y P68. (El antígeno purificado o aislado puede ser creado mediante métodos recombinantes, mediante métodos sintéticos o extraído de *T. gondii* después de la transcripción y la traducción del genoma del organismo). Adicionalmente, la muestra de ensayo puede ser pre-tratada con disolución antes de la adición de la fase sólida recubierta. De nuevo, la fase sólida puede ser, por ejemplo, un material poroso, un material no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula, una cuenta, una membrana, un pocillo de microtitulación o un tubo de plástico. En otra realización, la presente invención incluye un método para determinar la proporción de anticuerpo IgG de baja avidez anti-citomegalovirus humano en un paciente. Este método comprende las etapas de: a) añadir al menos un antígeno aislado de citomegalovirus humano (HCMV) a una disolución para crear un antígeno en fase líquida y recubrir con el al menos un antígeno aislado una fase sólida para crear un antígeno en fase sólida; b) en un primer análisis, poner en contacto una muestra de ensayo del paciente con una fase líquida que no comprende antígeno de HCMV y después con la fase sólida recubierta de la etapa a) durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de alta avidez y baja avidez a dicha fase sólida; c) lavar la fase sólida recubierta de la etapa b); d) en un segundo análisis, poner en contacto una muestra de ensayo del paciente con el antígeno en fase líquida, esto es, el antígeno en disolución y después con el antígeno en fase sólida durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de baja avidez a dicha fase sólida; e) lavar el antígeno en fase sólida puesto en contacto de la etapa d); f) añadir un producto conjugado al primer y segundo análisis durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anti-IgG/anticuerpo/antígeno en el primer y segundo análisis, donde el producto conjugado comprende un anticuerpo anti-IgG anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; g) detectar una señal generada por el compuesto generador de señal del primer y segundo análisis; h) determinar la razón entre la señal obtenida en el segundo análisis y la señal obtenida en el primer análisis, donde dicha razón representa la proporción de anticuerpo IgG de baja avidez anti-HCMV humano presente en la muestra del paciente; e i) multiplicar dicha razón de la etapa h) por 100 y restar la razón multiplicada de 100 con el fin de determinar un Índice de avidez. En una realización relacionada un Índice de avidez <50% indica que dicho paciente tiene IgG para CMV de baja avidez, un Índice de avidez ≥ 60% indica que dicho paciente tiene una IgG para CMV de alta avidez, y un Índice de avidez de 50% a 59% indica que el paciente tiene una avidez equívoca del anticuerpo IgG para CMV. Como alternativa, un Índice de avidez <40% indica que el paciente tiene una IgG para CMV de baja avidez, un Índice de avidez ≥ 70% indica que el paciente tiene una IgG para CMV de alta avidez, y un Índice de avidez de 40% a 69% indica que el paciente tiene una avidez equívoca del anticuerpo IgG para CMV. (De nuevo, un resultado "equívoco" es aquel que es incierto y necesita tomar otra muestra del paciente (p. ej., 2-3 semanas después de la primera prueba) y someterla a ensayo utilizando los métodos descritos en la presente memoria. No es un resultado de IgG de alta o baja avidez. Adicionalmente, un resultado "equívoco" también puede ser referido como un resultado "dudoso", "zona gris", "medio" o "moderado"). Un resultado de IgG de baja avidez para CMV indica que el paciente tiene una infección por CMV primaria, y un resultado de IgG de alta avidez para CMV indica que el paciente tiene una infección por CMV no primaria.

El "al menos un antígeno aislado" del método puede ser por ejemplo pp38, pp53, pp65, p130 o pp150. (El antígeno purificado o aislado puede ser creado mediante métodos recombinantes, métodos sintéticos o extraído de HMCV después de la transcripción y la traducción de las proteínas codificadas por el genoma del organismo). Adicionalmente, la muestra del paciente puede ser pre-tratada con disolución antes de la adición de la fase sólida recubierta. De nuevo, la fase sólida puede ser, por ejemplo, un material poroso, un material no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula, una cuenta, una membrana, un pocillo de microtitulación o un tubo de plástico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es un esquema del funcionamiento del Análisis Núm. 1 y el Análisis Núm. 2 para el análisis de Avidez de IgG de CMV ARCHITECT®.

La FIGURA 2 es un esquema del funcionamiento del Análisis Núm. 1 y el Análisis Núm. 2 para el análisis de Avidez de IgG de Toxoplasma ARCHITECT®.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las dificultades de los análisis conocidos que utilizan agentes caotrópicos para la determinación de la avidez de los anticuerpos IgG anti-CMV humano y anti-Toxoplasma humano se han descrito, con detalle, más arriba. En contraste, los métodos de la presente invención no utilizan reactivos caotrópicos. En concreto, los métodos de la presente invención utilizan el descubrimiento de que los anticuerpos IgG de baja avidez producidos durante la infección aguda tienen una baja afinidad por el "antígeno en fase líquida" y una elevada afinidad por el mismo "antígeno en fase sólida". Los anticuerpos IgG de alta avidez producidos durante la infección crónica, por el contrario, tienen una afinidad preferente por el "antígeno en fase líquida" en condiciones de análisis óptimas, incluyendo la dilución óptima de la muestra del paciente. De este modo, los métodos de la presente invención utilizan la afinidad diferencial de anticuerpos de baja y alta avidez hacia el "antígeno en fase sólida" y el mismo "antígeno en fase líquida" con el fin

de distinguir entre los anticuerpos de baja y alta avidez y de ese modo discriminan a nivel diagnóstico entre una infección aguda y una infección adquirida en el pasado lejano (esto es, infección crónica, infección no aguda o no primaria). En términos de uso, los análisis de avidez de la presente invención se pueden utilizar para ayudar en la diagnosis de la infección por CMV en mujeres embarazadas, por ejemplo, o para ayudar en la diagnosis de la toxoplasmosis en mujeres embarazadas.

Para los fines de la presente invención, la "avidez del anticuerpo" se define como la suma de las afinidades de unión de los dos dominios Fab presentes en cada molécula de IgG y el antígeno al cual se une.

Un "antígeno en fase líquida" se define como un antígeno en disolución, que comprende uno o más epítopos que se unen a un anticuerpo también libremente móvil en una disolución. Por el contrario, un "antígeno en fase sólida" se define como un antígeno que está anclado a una fase sólida, que comprende uno o más epítopos que pueden capturar un anticuerpo en disolución.

Una "fase sólida" puede ser un material poroso o no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.705.330), una cuenta, una membrana, y un pocillo de microtitulación o un tubo de plástico. La elección del material de la fase sólida así como del método de marcaje del antígeno, si se desea, se determina basándose en las características de funcionamiento del formato de análisis deseado.

Los "anticuerpos de baja avidez" se definen como aquellos anticuerpos que son producidos entre 0 y 4 meses después de la infección. Los "anticuerpos de alta avidez" se definen como aquellos anticuerpos que son producidos más de 4 meses después de la infección. Durante el transcurso de la infección, la avidez total de los anticuerpos IgG producidos en respuesta a la infección aumenta con el tiempo.

El "Índice de avidez" para un análisis de avidez se define como la proporción de anticuerpos IgG de alta avidez presente en la muestra del paciente 100 veces.

Los ejemplos de los fluidos biológicos que se pueden someter a ensayo utilizando el método de la presente invención incluyen sangre completa, plasma, suero, fluido cerebroespinal, saliva, lágrimas, lavados nasales o extractos acuosos de tejidos y células.

Un "agente infeccioso" se define como un organismo (p. ej., bacteria, hongo, virus o parásito) que es capaz de producir una enfermedad en un anfitrión susceptible.

El "producto conjugado" o "reactivo indicador" comprenderá un anticuerpo o un anti-anticuerpo, anclado a un "compuesto generador de señal" o "marca". Este "compuesto generador de señal" o "marca" es detectable tal cual o se puede hacer reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable (véase p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.395.472 B1). Los ejemplos del compuesto generador de señales incluyen cromógenos, radioisótopos (p. ej., I^{125}, I^{131}, P^{32}, H^{3}, S^{35} y C^{14}), compuestos fluorescentes (p. ej., fluoresceína o rodamina), compuestos quimioluminiscentes (p. ej., acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes complejantes, o catalizadores tales como enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En caso de utilizar enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), la adición de un sustrato cromo-, fluoro- o luminogénico da como resultado la generación de una señal detectable. También son útiles otros sistemas de detección tales como la fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de reflexión interna, amplificación (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa) y espectroscopía Raman.

La "disolución" de la presente invención se define como un líquido acuoso entre 0°C y 37°C. Los ejemplos incluyen tampones y diluyentes.

Como se ha indicado más arriba, un método de la presente invención es un formato de antígeno competitivo para la determinación de la avidez del anticuerpo IgG anti-HCMV humano. En primer lugar, se debe preparar un antígeno de HCMV que sea capaz de unirse a anticuerpos IgG anti-HCMV humano en disolución y después aplicarlo como recubrimiento sobre una fase sólida. Este antígeno viral se puede preparar mediante infección de células de mamífero en cultivo de tejidos con HCMV obtenido de un producto aislado clínico o de una provisión de partida comercial de las cepas de HCMV AD169, Towne, o Toledo (Trincado, D.E. et al. (2000) J. Med. Virol. 61, 481-487; Chee, M.S. et al. (1990) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154, 125-169; Lehner, R. et al. (1991) J. Clin. Microbiol. 29, 2494-2502) seguido de purificación del virus a partir de las células infectadas. Como alternativa, se pueden preparar antígenos de HCMV recombinantes purificados que sean capaces de unirse a anticuerpos IgG anti-HCMV humanos en disolución y después aplicarlos como recubrimiento sobre una fase sólida. Estos antígenos de HCMV recombinantes pueden incluir, pero no están limitados a, pp38 (UL80a), pp52 (UL44), pp65 (UL83), p130 (UL57), pp150 (UL32) (Maine et al. (2001) Expert Rev. Molec. Diagn. 1, 19-29; Patente de los Estados Unidos Núm. 6.074.817).

Los antígenos sintéticos o recombinantes del producto lisado viral de HCMV purificado se diluyen después en una disolución (p. ej., diluyente para antígenos tamponado) ("antígeno en fase líquida") y también se aplican como recubrimiento sobre una fase sólida ("antígeno en fase sólida"). Luego se llevan a cabo dos análisis en el formato de análisis de la avidez por el antígeno competitivo con el fin de determinar el Índice de avidez. En el ANÁLISIS Núm. 1 de la presente invención (sin antígeno de HCMV soluble), la muestra del paciente se diluye con la disolución de la muestra (p. ej., diluyente) y se incuba con disolución de antígeno tamponada (p. ej., diluyente) que no contiene antígenos de HCMV y con la fase sólida recubierta con antígeno de HCMV. Como alternativa, la muestra diluida puede ser "tratada previamente" con la disolución (p. ej., diluyente de antígeno tamponado) que no contiene antígeno de HCMV antes de la adición de la fase sólida recubierta con el antígeno de HCMV. En este análisis, se unen al "antígeno en fase sólida" anticuerpos IgG anti-HCMV humano tanto de baja como de alta avidez. Paralelamente, en el ANÁLISIS Núm. 2 de la presente invención (antígeno de HCMV soluble), la muestra del paciente se diluye con la disolución de la muestra (p. ej., diluyente) y se incuba con disolución de antígeno tamponada (p. ej., diluyente) que contiene el antígeno de HCMV y con la fase sólida recubierta con el antígeno de HCMV. Como alternativa, la muestra diluida puede ser "tratada previamente" con la disolución de antígeno tamponada que contiene el antígeno de HCMV antes de la adición de la fase sólida recubierta con el antígeno de HCMV. En este análisis, se unen al "antígeno en fase sólida" anticuerpos IgG anti-HCMV humano de baja avidez mientras los anticuerpos IgG anti-HCMV humano de alta avidez se unen al "antígeno en fase líquida". Después de la incubación de la muestra del paciente con la disolución de antígeno tamponada (con o sin antígeno de HCMV soluble) y la fase sólida recubierta con antígeno de HCMV, se lleva a cabo una etapa de lavado para separar los anticuerpos IgG humanos no unidos al antígeno de HCMV en fase sólida. En el ANÁLISIS Núm. 1, solamente se separan los anticuerpos IgG humanos no específicos de HCMV. En el ANÁLISIS Núm. 2, la etapa de lavado separa los anticuerpos IgG humanos no específicos de HCMV y los anticuerpos IgG de alta avidez anti-HCMV humano unidos al "antígeno en fase líquida". Con posterioridad en ambos análisis, se añade un producto conjugado anti-IgG humana que contiene un compuesto generador de señal y la señal obtenida es proporcional a la cantidad de IgG anti-HCMV humana unida a la fase sólida. Puesto que la etapa de lavado siguiente a la incubación del anticuerpo primario separa la IgG anti-HCMV humano de alta avidez, la razón de la señal obtenida en el ANÁLISIS Núm. 2 sobre la señal del ANÁLISIS Núm. 1 es proporcional al nivel de IgG de baja avidez de anti-HCMV humano presente en la muestra. Esto, en está contraste con el formato de análisis caotrópico de avidez, en el que la razón de las señales obtenidas es proporcional al nivel de IgG de alta avidez anti-HCMV humano presente en la muestra. Esto se debe al hecho de que la etapa de lavado del análisis caotrópico de avidez separa los anticuerpos IgG de baja avidez, mientras el formato de antígeno competitivo de la presente invención separa los anticuerpos IgG de alta avidez. Puesto que el "Índice de Avidez" para un análisis de avidez se define como la proporción de anticuerpos IgG de alta avidez presente en la muestra del paciente 100 veces, los resultados del análisis competitivo de avidez de antígenos se transforman matemáticamente como sigue:

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Señal del ANÁLISIS Núm. 2}}{\text{Señal del ANÁLISIS Núm. 1}} \right) \text{X } 100$$

Adicionalmente, como se ha indicado más arriba, otro método de la presente invención es un formato competitivo de antígenos para la determinación de la avidez de los anticuerpos IgG anti-Toxoplasma humano. En primer lugar, se debe preparar un antígeno de T. gondii que sea capaz de unirse a anticuerpos IgG anti-Toxoplasma humano en disolución y después aplicarse como recubrimiento sobre una fase sólida. Este antígeno del parásito se puede preparar mediante infección de ratones o células de mamíferos en cultivos de tejidos con T. gondii obtenido de un producto aislado clínico o de una provisión de partida comercial de la cepa RH, BK o C-56 (Reiter-Owona et al. (1999) Bull. World Health Org. 77, 929-935) seguido de purificación del antígeno del parásito de ratones o de células infectadas. Como alternativa, se pueden preparar antígenos de T. gondii recombinantes purificados que sean capaces de unirse a anticuerpos IgG anti-Toxoplasma humano en disolución y después aplicarse como recubrimiento sobre una fase sólida. Estos antígenos de T. gondii recombinantes pueden incluir, pero no están limitados a, P22 (SAG2), P24 (GRA1), P25, P28 (GRA2), P29 (GRA7), P30 (SAG1), P35 (GRA8), P41 (GRA4), P54 (ROP2), P66 (ROP1), P68 (Prince et al. (1990) Mol. Biochem. Parasitol 43, 97-106; Cesbron-Delauw et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 7537-7541; Johnson et al. (1991) Gene 99, 127-132; Prince et al. (1989) Mol. Biochem. Parasitol. 34, 3-13; Bonhomme et al. (1998) J. Histochem. Cytochem. 46, 1411-1421; Burg et al. (1988) J. Immunol. 141, 3584-3591; Knapp et al. (1989) EPA 431541A2; Carey et al. (2000) Molec. Biochem. Parasitol. 105, 25-37; Mevelec et al. (1992) Mol. Biochem. Parasitol. 56, 227-238; Saavedra et al. (1991) J. Immunol. 147, 1975-1982); EPA 751 147). Los antígenos de T. gondii sintéticos o recombinantes, del parásito purificados se diluyen después en una disolución (p. ej., diluyente de antígeno tamponado) ("antígeno en fase líquida") y también se aplican como recubrimiento sobre una fase sólida ("antígeno en fase sólida"). Después se llevan a cabo dos análisis en el formato de análisis competitivo de avidez de antígenos con el fin de determinar el Índice de Avidez. En el ANÁLISIS Núm. 1 (sin antígeno soluble de T. gondii), se diluye la muestra del paciente con disolución de la muestra (p. ej., diluyente) y se incuba con disolución de antígeno tamponada (p. ej., diluyente) que no contiene antígeno de T.gondii y con la fase sólida recubierta con el antígeno de T. gondii. Como alternativa, la muestra diluida se puede "tratar previamente" con el diluyente de antígeno tamponado que no contiene antígeno de T. gondii antes de la adición de

la fase sólida recubierta con antígeno de T.gondii. En este análisis, se unen al "antígeno en fase sólida" anticuerpos IgG anti-Toxoplasma humano tanto de baja como de alta avidez. Paralelamente, en el ANÁLISIS Núm. 2 (antígeno de T. gondii soluble) se diluye la muestra del paciente con la disolución de la muestra (p. ej., diluyente) y se incuba con disolución de antígeno tamponada (p. ej., diluyente) que contiene el antígeno de T. gondii y con la fase sólida recubierta con el antígeno de T. gondii. Como alternativa, la muestra diluida puede ser "tratada previamente" con la disolución de antígeno tamponada (p. ej., diluyente) que contiene el antígeno de T. gondii antes de la adición de la fase sólida recubierta con el antígeno de T. gondii. En este análisis, los anticuerpos IgG anti-Toxoplasma humano de baja avidez se unen al "antígeno en fase sólida" mientras los anticuerpos IgG anti-Toxoplasma humano de alta avidez se unen al "antígeno en fase líquida". Después de la incubación de la muestra del paciente con la disolución de antígeno tamponada (con o sin el antígeno de T. gondii soluble) y la fase sólida recubierta con el antígeno de T. gondii, se lleva a cabo una etapa de lavado para separar los anticuerpos IgG humanos no unidos al antígeno de T. gondii en fase sólida. En el ANÁLISIS Núm. 1 solamente se separan los anticuerpos IgG humanos no específicos de T.gondii. En el ANÁLISIS Núm. 2, la etapa de lavado separa los anticuerpos IgG humanos no específicos de T. gondii y los anticuerpos de alta avidez IgG anti-Toxoplasma humano unidos al "antígeno en fase líquida". Con posterioridad en ambos análisis, se añade un producto conjugado anti-IgG humana que contiene un compuesto generador de señal, y la señal obtenida es proporcional a la cantidad de IgG anti-Toxoplasma humano unida a la fase sólida. Puesto que la etapa de lavado siguiente a la incubación de anticuerpo primaria separa la IgG anti-Toxoplasma humano de alta avidez, la razón de la señal obtenida en el ANÁLISIS Núm. 2 sobre la señal del ANÁLISIS Núm. 1 es proporcional al nivel de IgG de baja avidez anti-Toxoplasma humano presente en la muestra. Esto contrasta con el formato de análisis de avidez caotrópico, donde la razón de las señales obtenidas es proporcional al nivel de IgG de alta avidez anti-Toxoplasma humano presente en la muestra. Esto se debe al hecho de que la etapa de lavado del análisis de avidez caotrópico separa los anticuerpos IgG de baja avidez mientras el formato de antígeno competitivo de la presente invención separa los anticuerpos IgG de alta avidez. Puesto que el "Índice de Avidez" para un análisis de avidez se define como la proporción de anticuerpos IgG de alta avidez presente en la muestra del paciente 100 veces, los resultados del análisis de avidez de antígenos competitivo se transforman matemáticamente como sigue:

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Señal del ANÁLISIS Núm. 2}}{\text{Señal del ANÁLISIS Núm. 1}} \right) \text{X } 100$$

Como se ha indicado más arriba, los anticuerpos IgG de baja avidez producidos durante la infección por CMV primaria o durante la toxoplasmosis aguda tienen una baja afinidad de unión al "antígeno en fase líquida" pero una elevada afinidad de unión al "antígeno en fase sólida" (p. ej., micropartículas o placas de micropartículas recubiertas con antígeno). En contraste, los anticuerpos IgG de alta avidez producidos durante la infección por CMV no primaria o durante la toxoplasmosis crónica se unen preferentemente al "antígeno en fase líquida" y no al "antígeno en fase sólida" siempre que el "antígeno en fase líquida" esté presente en cantidades suficientes para unirse a todos los anticuerpos IgG anti-CMV o anti-Toxo de alta avidez presentes en la muestra del paciente de interés. Esta condición se satisface diluyendo la muestra del paciente según se necesite en el análisis.

Con el fin de asegurar que los análisis de avidez de IgG de CMV y Toxoplasma en el formato de antígeno competitivo descrito más arriba se han realizado como se pretendía, se llevan a cabo periódicamente controles específicos del análisis para CMV y Toxoplasma, que contiene IgG de baja y alta avidez, para evaluar la validez del análisis de avidez. Con el fin de implementar estos controles, se debe obtener plasma fuente para controlar la implementación. El plasma fuente de la IgG de alta avidez para CMV y Toxoplasma es fácilmente obtenible debido a la seroprevalencia para estas enfermedades en la población general, esto es, individuos inmunes a CMV o Toxoplasma sanos pueden donar plasma que contiene IgG de alta avidez que puede ser utilizado para implementar los controles de IgG de alta avidez. En contraste, los individuos en la fase aguda de una infección por CMV o Toxoplasma, cuyo plasma contiene IgG de baja avidez, pueden no estar sanos y ser incapaces de donar su plasma para la implementación de los controles de IgG de baja avidez. Además, la fase aguda de la infección es relativamente corta y la incidencia de infección para CMV y Toxoplasma es relativamente baja, haciendo extremadamente difícil originar las cantidades adecuadas de plasma con IgG de baja avidez para CMV o Toxoplasma que son necesarias para la implementación de estos importantes controles de validez de los análisis. Puesto que los análisis de avidez de CMV y Toxoplasma descritos más arriba requieren la dilución apropiada de las muestras de los pacientes para proporcionar resultados de análisis válidos, un control de IgG de alta avidez, que contiene IgG de alta avidez con un título elevado, puede "imitar" un control de baja avidez cuando se lleva a cabo en un protocolo de dilución que no diluye el control en el intervalo de dilución correcto. Por consiguiente, otro aspecto de esta invención es el desarrollo de controles de IgG de baja avidez "simulada" para CMV y Toxoplasma, donde el título de IgG de dichos controles cuando se llevan a cabo en la dilución del protocolo alternativo para el control de baja avidez, supera el "bloqueo" por parte del "antígeno en fase líquida" produciendo un resultado de IgG de baja avidez.

La presente invención se puede ilustrar por medio del uso de los siguientes ejemplos no limitantes:

EJEMPLO 1

Metodología General

Materiales y Fuentes

Se obtuvieron Tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), TRIS-HCl, cloruro de sodio, EDTA, sacarosa, Quinolona (A56620), Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), ProClin 300, ProClin 950, Albúmina de Suero Bovino (BSA), hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, CAPS, CHAPS, azida, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), dodecilsulfato de sodio (SDS), micropartículas de poliestireno paramagnéticas, reserva de antígenos de CMV, Antiespumante, Triton X-405, Triton X-100, Cloruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Lisozima, Benzonasa, cloruro de magnesio, maltosa, Fracción V de Albúmina Bovina, Suero de ternera, Polisorbato 20, Hidroclouro de sarafloxacina, Tween 20, leche el polvo sin grasa Carnation, inmunoglobulina IgG de ratón, antígeno CKS precipitado con amonio, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), plasma humano recalcificado de alta avidez positivo para IgG contra CMV, plasma humano recalcificado de alta avidez positivo para IgG para Toxoplasma, plasma humano recalcificado de baja avidez positivo para IgG para CMV, plasma humano recalcificado negativo para IgG para CMV, suero de cordero, extracto de levadura, triptona, glicerina, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, ampicilina, Desespumante Mazu DF-60, hidróxido de amonio, casaminoácidos, ácido sulfúrico 6 N, ácido clorhídrico 6 N, hidróxido de sodio 6 N, disolución de EDTA 0,5 M, pH 9, isopropil-β-D-tiogalactosido (IPTG), solución salina tamponada con fosfato (PBS), suspensión de Flujo Rápido de Dietilaminoetil (DEAE)-Sefarosa, suspensión de Amilosa, producto concentrado conjugado marcado con acridinio anti-IgG humana ARCHITECT®, aparato ARCHITECT®, Diluyente para la Línea ARCHITECT®, Solución de Pre-Sensibilización, Solución de Sensibilización, y los artículos ARCHITECT® de Abbott Manufacturing, Inc. (Abbott Park, IL). Los kits de avidez de IgG para CMV Radim se adquirieron de Radim SpA (Roma, Italia). Los kits de avidez de IgG para Toxoplasma Vidas se adquirieron de BioMérieux SA (Lyon, Francia). El anticuerpo monoclonal IgG P30 anti-Toxoplasma humano se obtuvo de Celliance Corp. (Norcross, GA). El Sistema de Fusión y Purificación de Proteínas pMAL® fue adquirido de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Se siguieron los protocolos de New England BioLabs para la transformación de ADN en E. coli y para la purificación de la proteína de unión a maltosa (MBP). Las células de E. coli supercompetentes EPICURIAN Coli® XL-1 BLUE (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacI^q ZDM15 Tn10 (Tet^r)]) se obtuvieron de Stratagene Cloning Systems, Inc. (La Jolla, CA).

Medios, Tampones y Reactivos Generales

El "Diluyente de Micropartículas para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" y el "Tampón de Pre-Tratamiento 1 para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenían 4,44 g/L de TRIS, 2,65 g/L de TRIS-HCL, 5 g/L de cloruro de sodio, 3 g/L de EDTA, 100 g/L de sacarosa, 0,01 g/L de Quinolona (A56620), 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), 1 g/L de ProClin 300, 10 g/L de BSA, ajustado a pH 8,4 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El "Tampón de Recubrimiento de Micropartículas para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenía 22,14 g/L de CAPS, 4,38 g/L de cloruro de sodio, 1 g/L de CHAPS, 1 g/L de azida, ajustado a pH 11,0 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El "Tampón Concentrado de Micropartículas para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenía 2 L de "Tampón de Recubrimiento de Micropartículas para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®", 3 L de tampón MES 50 mM, pH 6,2, 0,2 L de micropartículas recubiertas con antígeno para CMV, y 1 L de "Diluyente para Micropartículas de Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®". La "Masa de Micropartículas para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenía 0,1 L de "Producto Concentrado de Micropartículas para IgG de CMV ARCHITECT®", 0,9 L de "Diluyente de Micropartículas para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®", y 0,1 mL de Antiespumante. El "Diluyente del Producto Conjugado para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenía 9,8 g/L de MES, 29 g/L de cloruro de sodio, 20 g/L de BSA, 30 ml/L de Triton X-405, 10 ml/L de Quinolona (A56620), 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), ajustado a un pH de 6,6 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. La "Masa de Producto Conjugado para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenía 0,03-0,06 mg/L de producto concentrado conjugado anti-IgG humana ARCHITECT®, 0,5 ml/L de Antiespumante, en "Diluyente para Producto Conjugado para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®". El "Bloqueador del Pretratamiento 2 para la Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenía 4,44 g/L de TRIS, 2,65 g/L de TRIS-HCL, 5 g/L de cloruro de sodio, 3 g/L de EDTA, 100 g/L de sacarosa, 0,01 g/L de Quinolona (A56620), 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), 1 g/L de ProClin 300, 10 g/L de BSA, 33,3-100 ml/L de reserva de antígeno de CMV, ajustada a un pH de 8,4 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El "Control de Alta Avidez de IgG por CMV ARCHITECT®" contenía plasma recalcificado de alta avidez positivo para IgG de CMV (intervalo del Índice de Avidez = 70-100%), plasma recalcificado negativo para IgG de CMV, 1 g/L de azida, y 15 ml/L de ProClin 950 al 9,5%. El "Control de Baja Avidez de IgG para CMV ARCHITECT® " contenía plasma recalcificado de baja avidez positivo para IgG de CMV (intervalo de Índice de Avidez = 10-30%), plasma recalcificado negativo para IgG de CMV, 1 g/L de azida, y 15 ml/L de ProClin 950 al 9,5%. El "Calibrador de Fondo de Avidez para IgG de CMV ARCHITECT®" contenía 0,25 L/L de plasma recalcificado negativo para IgG de CMV, 0,75 L/L de suero de cordero, 15 ml/L de ProClin 950 al 9,5%, y 1 g/L de azida. El "Medio de Inóculo de MBP" contenía 24 g/L de extracto de levadura, 12 g/L de triptona, 5 ml/L de glicerina, 1.7 g/L de Fosfato de potasio monobásico, 11,4 g/L de fosfato de potasio dibásico, 0,05 g/L de ampicilina. El "Medio de Fermentación de MBP" contenía 24 g/L de extracto de levadura, 12 g/L de triptona, 10 ml/L de glicerina,

1,7 g/L de fosfato de potasio monobásico, 11,4 g/L de fosfato de potasio dibásico, 0,05 g/L de ampicilina, 0,5 ml/L de Desespumante, Mazu DF-60. El "Medio de Fermentación de CKS" contenía 24 g/L de extracto de levadura, 12 g/L de triptona, 15 ml/L de glicerina, 1,7 g/L de fosfato de potasio monobásico, 11,4 g/L de fosfato de potasio dibásico, 10 g/L de casaminoácidos, 0,05 g/L de ampicilina, 0,5 ml/L de Desespumante, Mazu DF-60. El "Tampón de Lisis de MBP" contenía tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 0,05%, NaCl 50 mM, y EDTA 1 mM.

El "Diluyente de Micropartículas para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" contenía 2,11 g/L de TRIS, 11,43 g/L de TRIS-HCL, 8 g/L de cloruro de sodio, 3,72 g/L de EDTA, 132,5 g/L de sacarosa, 0,005 g/L de Quinolona (A56620), 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), 18 ml/L Polisorbato 20, 102,5 g/L de suero de ternera, ajustado a un pH de 7,5 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El "Tampón de Pretratamiento 1 para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" contenía 2,13 g/L de TRIS, 11,46 g/L de TRIS-HCl, 9,87 g/L de cloruro de sodio, 4,65 g/L de EDTA, 0,005 g/L de Quinolona, (A56620), 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), 0,01% de Antiespumante, 0,1 g/L de IgG de ratón, ajustado a un pH de 7,5 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El "Bloqueador de Pretratamiento para la Avidez de IgG pata Toxoplasma ARCHITECT®" contenía 2,13 g/L de TRIS, 11,46 g/L de TRIS-HCl, 9,87 g/L de cloruro de sodio, 4,65 g/L de EDTA, 0,005 g/L de Quinolona, (A56620), 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), Antiespumante al 0,01%, 0,1 g/L de IgG de ratón, 50-200 mg/L de rpMBP-ToxoP30MIX1, ajustado a un pH de 7,5 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El "Tampón de Recubrimiento de Micropartículas para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® " contenía MES 50 mM, Triton X-100 al 0,0005%, pH 6,2. El "Diluyente del Producto Conjugado para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" contenía 9,8 g/L de MES, 29 g/L de cloruro de sodio, 20 g/L de Fracción V de Albúmina Bovina, 30 ml/L de Triton X-405, 10 ml/L de Quinolona (A56620), 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), 0,8 g/L de azida de sodio, ajustado a un pH de 6,6 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. La "Masa del Producto Conjugado para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" contenía 0,015-0,09 mg/L de producto concentrado conjugado con anti-IgG humana ARCHITECT®, 1 ml/L de Antiespumante, en "Diluyente de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®". El "Diluyente Específico para el Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" contenía 2,13 g/L de TRIS, 11,43 de TRIS-HCl g/L, 9,87 g/L de cloruro de sodio, 300 ml/L de suero de ternera, 4,65 g/L de EDTA, 1 g/L de Nipasept (sal de sodio de alquilparabeno), 0,005 g/L de Hidrocloruro de Sarafloxacina, 1,8 ml/L de Tween 20, 10 g/L de Leche en Polvo No grasa Carnation, 100 mg/L de producto lisado de MBP, 100 mg/L de rpCKS precipitado con sulfato de amonio, 100 mg/L de IgG de ratón, 1 ml/L de Antiespumante, ajustado a un pH de 7,5 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El "Control de Alta Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" contenía plasma recalcificado de alta avidez positivo para IgG de Toxoplasma (intervalo del Índice de Avidez = 60-100%), plasma recalcificado negativo para IgG de Toxoplasma, 1 g/L de azida, y 15 ml/L de ProClin 950 al 9,5%. El "Control de Baja Avidez para IgG de Toxoplasma ARCHITECT®" contenía anticuerpo monoclonal de baja avidez IgG anti-P30 de Toxoplasma (intervalo del Índice de Avidez = 10-20%), BSA, 10 g/L, 1 g/L de azida, y 15 ml/L de ProClin 950 al 9,5%. El "Calibrador de Fondo para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" contenía Diluyente para la Línea ARCHITECT®.

EJEMPLO 2

Fabricación de Kit de Reactivos, Calibrador, Controles del Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®, y Programa de Análisis

Etapa A: Recubrimiento con Antígeno Viral de CMV sobre Micropartículas y Fabricación del Reactivo para la masa de Micropartículas

Se lavaron micropartículas de poliestireno paramagnéticas una vez con "Tampón de Recubrimiento de Micropartículas para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" y después se resuspendieron a una concentración final de 1% en tampón de recubrimiento. La reserva de antígeno de CMV se descongeló después a la temperatura ambiente, se sometió a sonicación con 6 golpes de x 5 segundos con una amplitud de pausa de 30%, y después se centrifugó a 500 x g durante 30 minutos para separar el virus de los desechos celulares residuales. Se añadió el sobrenadante de antígeno viral al tampón de recubrimiento que contenía las micropartículas a una concentración de aproximadamente 1-25 ml de sobrenadante de antígeno viral por litro de tampón de recubrimiento y se incubó durante 30 minutos con agitación. Las micropartículas recubiertas con antígeno viral se lavaron tres veces con tampón MES 50 mM, pH 6,2, y se resuspendieron a una concentración final de 1% de sólidos en "Tampón Concentrado para Micropartículas para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" y se almacenaron a 2-8°C. El producto concentrado de micropartículas se diluyó después 1:10 con "Diluyente para Micropartículas para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®", se añadió antiespumante y se cargó el reactivo para la "Masa de Micropartículas para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" en las botellas de reactivo y se almacenaron a 2-8°C.

Etapa B: Fabricación de Reactivo para la Masa de Producto Conjugado

Se diluyó producto conjugado marcado con acridinio anti-IgG humana ARCHITECT® a una concentración final de 30-60 ng/ml en "Diluyente de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" para dar la "Masa

de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" que después se cargó en botellas de reactivo y se almacenó a 2-8°C.

Etapa C: Fabricación de Tampón de Pretratamiento 1

Se preparó "Tampón de Pretratamiento 1 para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" utilizando la receta del Ejemplo 1, que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C.

Etapa D: Fabricación de Bloqueador de Pretratamiento 2

Se preparó "Bloqueador de Pretratamiento para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" utilizando la receta del Ejemplo 1, que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C. El "Paquete de Reactivos de IgG para CMV ARCHITECT®" se define como los reactivos descritos en los Ejemplos 2A-2D.

Etapa E: Fabricación de Calibrador de Fondo

Se preparó el "Calibrador de Fondo para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" utilizando la receta del Ejemplo 1, que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C.

Etapa F: Fabricación de Controles

Se prepararon "Control de Alta Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" y "Control de Baja Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" utilizando las recetas del Ejemplo 1, que después se cargaron en botellas para reactivos y se almacenaron a 2-8°C.

Etapa G: Fabricación del Programa de Análisis

El programa de análisis requerido para llevar a cabo el Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT® en el aparato ARCHITECT® se proporciona en un CD-ROM para ser cargado en el aparato ARCHITECT® antes de llevar a cabo el análisis. El programa de análisis controla las etapas de pipeteado, dispensado, y mezclado de todos los reactivos en la secuencia requerida en el aparato con el fin de realizar el análisis como se describe más abajo y como se muestra en la Figura 1.

EJEMPLO 3

Funcionamiento del Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®
Etapa A: Configuración del Aparato ARCHITECT® y Carga del Paquete de Reactivos

El operario configura el aparato ARCHITECT® para realizar el análisis cargando el programa de análisis desde el CD-ROM (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El programa requerido para realizar el análisis contiene dos archivos, ANÁLISIS núm. 1 y ANÁLISIS núm. 2. El ANÁLISIS Núm. 1 y el ANÁLISIS Núm. 2 se deben realizar con cada muestra con el fin de calcular el Índice de Avidez como se muestra más abajo. El operario también configura un archivo de análisis adicional utilizando la interfaz del usuario del aparato ARCHITECT®, que calcula el Índice de Avidez, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{ULR de la Muestra – URL del Calibrador (Análisis Núm. 2)}}{\text{ULR de la Muestra – ULR del calibrador (Análisis Núm. 1)}} \right) \text{X } 100$$

La "ULR de la Muestra " se define como el resultado del análisis de la muestra del paciente expresado en Unidades de Luz Relativa (ULR); la "ULR del Calibrador" se define como el resultado del análisis en ULR utilizando el "Calibrador de Fondo para la Avidez de la IgG para CMV ARCHITECT®"; el "ANÁLISIS Núm. 2" se define como el análisis que pre-trata la muestra, el control, o el calibrador con el "Bloqueador de Pretratamiento 2 para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®"; el "ANÁLISIS Núm. 1" se define como el análisis que pre-trata la muestra, el control, o el calibrador con el "Tampón de Pretratamiento 1 para la avidez de IgG para CMV ARCHITECT®"; y el "Índice de Avidez" que se define por medio de la ecuación anterior y se expresa en porcentaje es proporcional al nivel de IgG de alta avidez anti-HCMV humana presente en la muestra. Las muestras que tienen un valor del Índice de Avidez < 50% contienen IgG para CMV de baja avidez, ≥ 60% contienen IgG para CMV de alta avidez, y entre 50 y 59% son equívocas para la avidez del anticuerpo IgG para CMV.

El operario carga el "Paquete de Reactivos de IgG para CMV ARCHITECT®" en el aparato ARCHITECT® como sigue: se carga "Tampón de Pretratamiento 1 para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" en la Posición Núm. 1, código de color amarillo; se carga la "Masa de Micropartículas para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" en la Posición Núm. 2, código de color rosa; se carga la "Masa de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" en la Posición Núm. 3, código de color negro; y se carga "Bloqueador de Pretratamiento 2 para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" en la Posición Núm. 5, código de color rosa.

Etapa B: Ordenamiento el Ensayo de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®

Antes de ejecutar el ensayo de avidez de IgG para CMV ARCHITECT®, el operario debe seleccionar el protocolo de dilución apropiado para los ANÁLISIS Núms. 1 y 2 basados en el título de IgG para CMV de cada muestra expresado en UA/ml a partir del análisis de IgG para CMV ARCHITECT® como sigue: Protocolo de Dilución Núm. 1, 5-16 UA/ml; Protocolo de Dilución Núm. 2, 16-50 UA/ml; Protocolo de Dilución Núm. 3, 50-150 UA/ml; Protocolo de Dilución Núm. 4, 150-500 UA/ml; para muestras con un título de IgG para CMV > 500 UA/ml, la muestra se diluye manualmente hasta un título de 10 UA/ml y se ejecuta el Protocolo de Dilución Núm. 1. Después las muestras se cargan en el aparato. El "Calibrador de Fondo de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" se carga en el aparato para la calibración del análisis y se cargan el "Control de Alta Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" y el "Control de Baja Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" para asegurarse de que los resultados del análisis son válidos.

Etapa C: Descripción del Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®

Se necesitan aproximadamente 10-72 µl de cada muestra para los ANÁLISIS Núms. 1 y 2 dependiendo del protocolo de dilución solicitado por el operario. Las siguientes etapas para los ANÁLISIS Núms. 1 y 2 son idénticas excepto por la etapa de pretratamiento: La sonda de pipeteado aspira la cantidad de muestra requerida para cada análisis y realiza la dilución de muestra apropiada con el Diluyente para la Línea ARCHITECT®; en la etapa de pretratamiento para el ANÁLISIS Núm. 2, la sonda de pipeteado dispensa "Bloqueador de Pretratamiento 2 para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®", que contiene el antígeno viral de HCMV presente en la fase líquida y que se una a la IgG de alta avidez anti-HCMV humana, en la muestra diluida; en la etapa de pretratamiento para el ANÁLISIS Núm. 1, la sonda de pipeteado dispensa "Tampón de Pretratamiento 1 para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®", que contiene solamente tampón, en la muestra diluida; las muestras pretratadas se incuban durante 7 minutos; la sonda de pipeteado dispensa después 50 µl de "Masa de Micropartículas para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" en las "muestras pretratadas" y las muestras se incuban durante 18 minutos; los anticuerpos IgG anti-HCMV humanos de baja avidez se unen a la fase sólida recubierta con antígeno viral de HCMV en el ANÁLISIS Núm. 2 mientras los anticuerpos IgG anti-HCMV humanos de alta y baja avidez se unen a la fase sólida recubierta con antígeno viral de HCMV en el ANÁLISIS Núm.1; después se lavan las micropartículas con Diluyente para la Línea ARCHITECT® y luego la sonda de pipeteado dispensa 50 µl de "Masa de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" y las micropartículas se incuban con el producto conjugado durante 4 minutos; las micropartículas se lavan de nuevo con Diluyente Para la Línea ARCHITECT® y después se tratan con reactivo de Pre-Sensibilización y de Sensibilización ARCHITECT®; la señal quimioluminiscente resultante generada es leída por el aparato ARCHITECT® y presentada como ULR para cada muestra y almacenada para el ANÁLISIS Núm. 1 y el ANÁLISIS Núm. 2; una vez completada la ronda, el aparato resta la ULR del "Calibrador de Fondo para la Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" de cada muestra para el ANÁLISIS Núm. 1 y el ANÁLISIS Núm. 2 y calcula el Índice de Avidez como se ha descrito más arriba; después del resultado del Índice de Avidez también se presenta la interpretación del resultado de acuerdo con el siguiente algoritmo; las muestras que tienen un valor del Índice de Avidez < 50% contienen IgG para CMV de baja avidez; ≥ 60% contienen IgG para CMV de alta avidez; y entre 50 y 59% son equívocas para la avidez del anticuerpo IgG para CMV.

EJEMPLO 4

Evaluación del Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®

Etapa A: Suero Humano para el Ensayo

Se sometieron a ensayo tres grupos de sueros en esta evaluación: el Grupo 1 (n = 256) consistía en sueros de donantes al azar (n = 126) y mujeres embarazadas (n = 130) que eran negativos para el anticuerpo IgM para CMV y positivos para el anticuerpo IgG para CMV; el Grupo 2 (n = 35) consistía en muestras sangre seriadas de tres individuos con infección por HCMV primaria como se documentó mediante seroconversión (n = 2) o mediante la presencia de anticuerpos IgM para CMV e IgG para CMV de baja avidez (n = 1); el Grupo 3 (n = 37) consistía en muestras de sangre seriadas de 20 mujeres embarazadas con infección por HCMV primaria como se documentó mediante seroconversión (n = 18) o mediante la presencia de anticuerpos IgM para CMV e IgG para CMV de baja avidez (n = 2).

Etapa B: Comparación del Funcionamiento del Análisis de Avidez para IgG de CMV ARCHITECT® con el Análisis de Avidez de IgG de CMV Radim y Datos Clínicos

El análisis de avidez de IgG para CMV Radim (Radim SpA, Roma, Italia) consiste en dos análisis de IgG de CMV realizados por duplicado y distingue entre los especímenes que contienen baja y alta avidez incorporando una etapa de lavado caotrópico con urea después de la incubación con anticuerpo primario en uno de los dos análisis de IgG para CMV. El Índice de Avidez para el análisis de avidez de IgG para CMV Radim (Radim SpA, Roma, Italia) se calculó como sigue por medio del prospecto del paquete del fabricante utilizando la Densidad Óptica (D.O):

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = \frac{\text{D.O. con Reactivo de Disoc. (Urea)}}{\text{D.O. con Diluyente de la Muestra}} \times 100$$

Los resultados para este análisis se interpretaron de acuerdo con el prospecto del paquete (Radim SpA, Roma, Italia).

Se utilizaron las muestras del Grupo 1 (CMV IgM- IgG+) para evaluar la especificidad clínica de los análisis de avidez. Las muestras que son negativas para IgM de CMV y positivas para el anticuerpo IgG de CMV deben contener una IgG de alta avidez ya que esta población es inmune a HCMV y no tiene una infección por HCMV activa. Los resultados con muestras del Grupo 1 se muestran más abajo en la Tabla 1:

TABLA 1

Evaluación del Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT® en Muestras del Grupo 1 (CMV IgG+ IgM-)					
		Avidez de IgG para CMV Radim			
		BAJA	EQV	ALTA	TOTAL
Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®	BAJA	1	0	0	1
	EQV	0	0	4	4
	ALTA	1	0	250	251
	TOTAL	2	0	254	256
Concordancia Relativa ARCHITECT®/Radim: 251/252 = 99,6% Especificidad Clínica ARCHITECT®: 251/252 = 99,6% Especificidad Clínica Radim: 254/256 = 99,2% Radim (Radim SpA, Roma, Italia)					

Como se puede observar a partir de la Tabla 1, los resultados de las muestras en los análisis de avidez ARCHITECT® y Radim (Radim SpA, Roma, Italia) concuerdan de una forma excelente, esto es, las muestras con resultados de baja y alta avidez en el análisis ARCHITECT® también tienen los correspondientes resultados de baja y alta avidez, respectivamente, en el análisis Radim (Radim SpA, Roma, Italia). Ambos análisis también demuestran una elevada especificidad clínica, esto es, la mayor parte de todas las muestras que fueron negativas para IgM para CMV y positivas para el anticuerpo IgG para CMV contenían IgG para CMV de alta avidez.

Las muestras del Grupo 2 y el Grupo 3 se utilizaron para evaluar la sensibilidad clínica de los análisis de avidez. Estas muestras fueron de individuos con una infección por HCMV primaria. Se eligió un corte de 4 meses para la evaluación de la sensibilidad clínica y se basó en la capacidad de un análisis de avidez para excluir una infección por HCMV primaria en mujeres embarazadas durante el primer trimestre de gestación (3 meses). Los resultados con las muestras del Grupo 2 y del Grupo 3 se muestran en la Tabla 2:

TABLA 2

Evaluación del Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT® en Muestras del Grupo 2 y el Grupo 3					
		Avidez de IgG para CMV Radim			
		BAJA	EQV	ALTA	TOTAL
Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®	BAJA	59	8	3	70
	EQV	0	0	0	0
	ALTA	0	1	1	2
	TOTAL	59	9	4	72
Concordancia Relativa ARCHITECT®/Radim: 60/63 = 95,2% Sensibilidad Clínica ARCHITECT®: 70/72 = 97,2% Sensibilidad Clínica Radim: 59/63 = 93,7% Radim (Radim SpA, Roma, Italia)					

Como se puede observar a partir de la Tabla 2, los análisis ARCHITECT® y Radim (Radim SpA, Roma, Italia) concuerdan bien entre sí, esto es las muestras con resultados de baja y alta avidez en el análisis ARCHITECT® también tienen resultados de baja y alta avidez correspondientes, respectivamente, en el análisis Radim (Radim SpA, Roma, Italia). Ambos análisis también demuestran una buena sensibilidad clínica. La tasa de maduración de la avidez parece ser más lenta para el análisis ARCHITECT® con respecto al análisis Radim (Radim SpA, Roma, Italia) como se muestra por medio de las 11 muestras que tenían una avidez baja por medio del análisis ARCHITECT® y equívoca (n = 8) o alta (n = 3) por medio del análisis Radim (Radim SpA, Roma, Italia). Basándose en esto datos el análisis de avidez de IgG para CMV ARCHITECT® es más sensible para la detección de la infección primaria por HCMV.

Se evaluó la correlación entre los resultados de los análisis de avidez de IgG para CMV ARCHITECT® y Radim (Radim SpA, Roma, Italia) a través de las muestras de los Grupos 1-3 (n = 215) y se obtuvo un coeficiente de correlación de r = 0,88. Este fue un resultado sorprendente e inesperado por dos razones: primero, los análisis de avidez son cualitativos, y por consiguiente no habría que esperar necesariamente una concordancia cuantitativa; y segundo, utilizan formatos de análisis muy diferentes, esto es, el formato de antígeno competitivo separa selectivamente la IgG de alta avidez de la muestra del paciente, mientras el formato caotrópico separa la IgG de baja avidez en una etapa de lavado.

Existen varias ventajas del formato de antígeno competitivo de la avidez de IgG para CMV ARCHITECT® de la presente invención sobre el formato caotrópico de otros análisis de avidez de IgG para CMV. Primero, no se requieren reactivos caotrópicos para realizar el análisis. Los reactivos caotrópicos pueden ser peligrosos o corrosivos para una plataforma de un aparato de inmunoanálisis automático y también puede contaminar de forma cruzada otros análisis ocasionando de ese modo resultados aberrantes. Segundo, se sabe que el Índice de Avidez resulta afectado hasta cierto punto por la concentración de anti-IgG humana frente a un agente infeccioso (Hedman, K. y Seppala, I., supra). La mayoría de los análisis de avidez convencionales que emplean reactivos caotrópicos no compensan este efecto mientras la presente invención utiliza una serie de protocolos de dilución para diluir las muestras en el intervalo apropiado, asegurando de este modo que el resultado del Índice de Avidez no es confundido por el título de anti-IgG presente en las muestras de los pacientes. Finalmente, el formato de antígeno competitivo de la presente invención demostró una mejor detección de los especímenes de pacientes con infección por HCMV primaria.

EJEMPLO 5

Fabricación de Producto Lisado de MBP y rpMBP-ToxoP30MIX1

Se ha descubierto que la fusión de la proteína de unión a maltosa (MBP) de E. coli y el sistema de purificación descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.643.758 son útiles para la producción y la purificación se proteínas de fusión solubles en E. coli. Se obtuvo el plásmido pMAL-c2X de New England BioLabs, Inc. y se transformó en células de E. coli supercompetentes EPICURIAN Coli® XL-1 BLUE utilizando los protocolos del proveedor. Esta cepa se utilizó con posterioridad para la producción de producto lisado de MBP. La cepa de E. coli EPICURIAN Coli® XL-1 BLUE que contiene el constructo pMBP-c2X-ToxoP30MIX1 descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.094.879 se utilizó para la producción de rpMBP-ToxoP30 purificada. La cepa de E. coli EPICURIAN Coli® XL-1 BLUE que contiene el constructo CKS-ToxoP35-CKS descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.329.157 B1 se utilizó para la producción de la proteína rpCKS-ToxoP35 purificada.

Etapa A: Preparación de producto lisado de MBP

La cepa de E. coli que contenía el plásmido pMAL-c2X fue inoculada en un matraz con "Medio de Inóculo MBP" y desarrollada a 37°C con sacudimiento a una D.O a 600 nm de 0,8-1,2. Este cultivo se utilizó para inocular un fermentador de 10 L que contenía "Medio de Fermentación MBP" y se desarrolló a 37°C, con agitación a 500 rpm, aireación a 15 slpm, y presión a 345 mbares. El cultivo de fermentación se desarrolló a una D.O a 600 nm de 6,0-8,0 y después se indujo con 50 mg/L de IPTG. A las 4 horas de la inducción, se concentró la cosecha del fermentador mediante diafiltración frente a PBS y se centrifugó a 14.000 x g durante 25 minutos a 2-8°C. Se tomaron alícuotas de la pasta celular del fermentador y después se almacenaron a -70°C hasta la producción del producto lisado.

La pasta celular se descongeló y se transfirió a 10 ml de "Tampón de Lisis de MBP" por gramo de pasta celular que contenía 0,2 ml/L de disolución de Benzonasa, 6,2 g/L de cloruro de magnesio, y 2 g/L de Lisozima y se homogeneizó. Se añadió disolución de PMSF (1 ml/g de pasta celular), se homogeneizó, y se incubó durante 60 minutos a 37°C con sacudimiento. Después se añadió un volumen igual de agua destilada fría y se incubó durante 15 minutos a 37°C con sacudimiento. La pasta celular lisada se centrifugó a 15.000 x g durante 45 minutos a 2-8°C. El sobrenadante se recuperó, se aclaró mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µ, y se almacenó a -70°C.

Etapa B: Purificación de rpMBP-ToxoP30MIX1

La cepa de E. coli que contenía el plásmido pMBP-c2X-ToxoP30MIX1 se inoculó en un matraz con "Medio de Inóculo de MBP" y se desarrolló a 36°C con sacudimiento a una D.O a 600 nm de 0,8-1,2. Este cultivo se utilizó para inocular un fermentador de 10L que contenía "Medio de Fermentación de MBP" y se desarrolló a 36°C, con agitación a 500 rpm, aireación a 15 slpm, y presión a 345 mbares. El cultivo de fermentación se desarrolló a una D.O a 600 nm de 6,0-8,0 y después se indujo con 50 mg/L de IPTG. A las 4 horas de la inducción, se concentró la cosecha del fermentador mediante diafiltración frente a PBS y se centrifugó a 14.000 x g durante 25 minutos a 2-8°C. Se tomaron alícuotas de la pasta celular del fermentador y después se almacenaron a -70°C hasta la purificación de la proteína.

La pasta celular se descongeló y se transfirió a 10 ml de "Tampón de Lisis de MBP" por gramo de pasta celular que contenía 0,2 ml/L de disolución de Benzonasa, 6,2 g/L de cloruro de magnesio, y 2 g/L de Lisozima y se homogeneizó. Se añadió disolución de PMSF (1 ml/g de pasta celular), se homogeneizó, y se incubó durante 60 minutos a 37°C con sacudimiento. Después se añadió un volumen igual de agua destilada fría y se incubó durante 15 minutos a 37°C con sacudimiento. La pasta celular lisada se centrifugó a 15.000 x g durante 45 minutos a 2-8°C. El sobrenadante se recuperó y se aclaró mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µ.

Después se aplicó el sobrenadante a una columna de Flujo Rápido de DEAE Sefarosa equilibrada con tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, NaCl 25 mM, y EDTA 1 mM. La columna se lavó exhaustivamente con este tampón y después se hizo eluir con tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM y después se almacenó la reserva del pico eluido durante 12 a 24 horas a 2 - 8°C.

La fracción de proteína del pico de la columna de DEAE se aplicó a una columna de resina de Amilosa equilibrada con tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM. La columna se lavó exhaustivamente con este tampón y la proteína rpMBP-ToxoP30 se hizo eluir después con NaCl 50 mM, Maltosa 10 mM, azida al 0,2%. La reserva del pico eluido se recuperó y se aclaró mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µ y se almacenó a -70°C hasta el recubrimiento de las micropartículas.

EJEMPLO 6

Fabricación del Kit de Reactivos, Calibrador, Controles del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®, y Programa de Análisis

Etapa A: Recubrimiento con el Antígeno rpMBP-ToxoP30 Sobre Micropartículas y Fabricación de Reactivo para la Masa de Micropartículas

Se descongeló el antígeno rpMBP-ToxoP30MIX1 a la temperatura ambiente y se diluyó a una concentración final de 1 mg/ml en fosfato 50 mM, cloruro de sodio 50 mM, EDTA 1 mM, maltosa 10 mM, azida al 0,2%, pH 7,5 y se incubó durante 5 días a 37°C para replegar el antígeno. El antígeno se almacenó después a 2-8°C durante 1 día antes del recubrimiento de las micropartículas.

Se lavaron dos veces micropartículas de poliestireno paramagnéticas con "Tampón de Recubrimiento de Micropartículas para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" y después se resuspendió a una concentración final de 1,33% en tampón de recubrimiento. Después se añadió el antígeno rpMBP-ToxoP30MIX1 replegado a las micropartículas lavadas a una concentración de proteína final de 100 µg/ml y se mezcló durante 10 minutos a 15-30°C. Luego se añadió EDAC a la reacción de recubrimiento de las micropartículas a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó mezclando durante 30 minutos a 15-30°C. Se añadió tampón TRIS 1M,

pH 8,0 a la reacción de recubrimiento de micropartículas a una concentración final 0,1 M y se incubó mezclando otros 30 minutos a 15-30°C. Las micropartículas recubiertas se lavaron después con MES 50 mM, pH 6,2 para separar el antígeno no unido, los reaccionantes, y se resuspendieron a una concentración final de 1% de sólidos en "Diluyente de Micropartículas para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®". Se preparó el "Reactivo para la Masa de Micropartículas para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" diluyendo el producto concentrado de micropartículas a una concentración final de 0,1% de sólidos con "Diluyente de Micropartículas para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®", que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C.

Etapa B: Fabricación de Reactivo para la Masa de Producto Conjugado

Se diluyó el producto conjugado marcado con acridinio anti-IgG humana ARCHITECT® a una concentración final de 15-90 ng/ml en "Diluyente de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" para producir la "Masa de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C.

Etapa C: Fabricación de Tampón de Pretratamiento 1

Se preparó "Tampón de Pretratamiento 1 para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" utilizando la receta del Ejemplo 1, que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C.

Etapa D: Fabricación de Bloqueador de Pretratamiento 2

Se preparó "Bloqueador de Pretratamiento 2 para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" utilizando la receta del Ejemplo 1, que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C.

Etapa E: Fabricación del Diluyente Específico del Análisis

Se preparó "Diluyente Específico del Análisis para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" utilizando la receta del Ejemplo 1, que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C. El "Paquete de Reactivos de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" se define como los reactivos descritos en los Ejemplos 6A-6E.

Etapa F: Fabricación del Calibrador de Fondo

Se preparó el "Calibrador de Fondo para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" utilizando la receta del Ejemplo 1, que se cargó después en botellas de reactivos y se almacenó a 2-8°C.

Etapa G: Fabricación de Controles

Se prepararon "Control de Alta Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" y "Control de Baja Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" utilizando las recetas del Ejemplo 1, que después se cargaron en botellas para reactivos y se almacenaron a 2-8°C.

Etapa H: Fabricación del Programa de Análisis

El programa de análisis requerido para hacer funcionar el aparato para el análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® se proporciona en un CD-ROM que debe ser cargado en el aparato ARCHITECT® antes de realizar el análisis (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El programa de análisis controla las etapas de pipeteado, dispensado, y mezclado de todos los reactivos en la secuencia requerida en el aparato con el fin de realizar el análisis como se describe más abajo y como se muestra en la Figura 2.

EJEMPLO 7

Funcionamiento del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®

Etapa A: Configuración del Aparato ARCHITECT® y Carga del Paquete de Reactivos

El operario configura el aparato ARCHITECT® para realizar el análisis por medio del programa de análisis del CD-ROM. El programa requerido para realizar el análisis contiene dos archivos de análisis, ANÁLISIS núm. 1 Y ANÁLISIS núm. 2. El ANÁLISIS Núm. 1 y el ANÁLISIS Núm. 2 se deben realizar en cada muestra con el fin de calcular el Índice de Avidez como se muestra más abajo. El operario también configura un archivo de análisis adicional utilizando la interfaz de usuario del aparato ARCHITECT®, que calcula el Índice de Avidez, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{ULR de la Muestra – ULR del Calibrador (Análisis Núm. 2)}}{\text{ULR de la Muestra – ULR del Calibrador (Análisis Núm. 1)}} \right) \text{X } 100$$

La "ULR de la Muestra " se define como el resultado del análisis de la muestra del paciente expresado en Unidades de Luz Relativa (ULR); la "ULR del Calibrador" se define como el resultado del análisis en ULR utilizando el "Calibrador de Fondo para la Avidez de la IgG para Toxoplasma ARCHITECT®"; el "ANÁLISIS Núm. 2" se define como el análisis que pre-trata la muestra, el control, o el calibrador con el "Bloqueador de Pretratamiento 2 para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®"; el "ANÁLISIS Núm. 1" se define como el análisis que pre-trata la muestra, el control, o el calibrador con el "Tampón de Pretratamiento 1 para la avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®"; y el "Índice de Avidez" que se define por medio de la ecuación anterior y se expresa en porcentaje es proporcional al nivel de IgG de alta avidez anti-Toxoplasma humano presente en la muestra. Las muestras que tienen un valor del Índice de Avidez < 30% contienen IgG para Toxoplasma de baja avidez, ≥ 40% contienen IgG para Toxoplasma de alta avidez, y entre 30 y 39% son equívocas para la avidez del anticuerpo IgG para Toxoplasma.

El operario carga el "Paquete de Reactivos de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" en el aparato ARCHITECT® como sigue: El "Diluyente Específico del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® " se carga en la Posición Núm. 1, código de color amarillo; la "Masa de Micropartículas para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" se carga en la Posición Núm. 2, código de color rosa; La "Masa de Producto Conjugado para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" se carga en la Posición Núm. 3, código de color negro; el "Tampón de Pretratamiento 1 para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" se carga en la Posición Núm. 4, código de color amarillo; y el "Bloqueador de Pretratamiento 2 para la Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" se carga en la Posición Núm. 5, código de color rosa.

Etapa B: Ordenamiento del Ensayo de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®

Antes de llevar a cabo el ensayo de avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®, el operario debe seleccionar el protocolo de dilución apropiado para los ANÁLISIS Núms. 1 y 2 basándose en el título de IgG para Toxoplasma de cada muestra expresado en UI/ml a partir del análisis de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® como sigue: Protocolo de Dilución Núm. 1, 3-20 UI/ml; Protocolo de Dilución Núm. 2, 21-200 UI/ml; Protocolo de Dilución Núm. 3, 201-2000 UI/ml; para las muestras con un título de IgG para Toxoplasma > 2000 UI/ml, la muestra se diluye manualmente hasta un título de 10 UI/ml y se lleva a cabo el Protocolo de Dilución Núm. 1. Las muestras se cargan después en el aparato. El "Calibrador de Fondo de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" se carga en el aparato de calibración del análisis y el "Control de Alta Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" y el "Control de Baja Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" se cargan para asegurar que los resultados del análisis sean válidos.

Etapa C: Descripción del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®

Se necesitan aproximadamente 5-80 µl de cada muestra para los ANÁLISIS Núms. 1 y 2 dependiendo del protocolo de dilución solicitado por el operario. Las siguientes etapas para los ANÁLISIS Núms. 1 y 2 son idénticas excepto por la etapa de pretratamiento: La sonda de pipeteado aspira la cantidad de muestra requerida para cada análisis y realiza la dilución de la muestra apropiada con Diluyente para la Línea ARCHITECT®; en la etapa de pretratamiento para el ANÁLISIS Núm. 2, la sonda de pipeteado dispensa "Bloqueador de Pretratamiento 2 de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®", que contiene el antígeno rpMBP-ToxoP30MIX1 presente en la fase líquida y que se une a la IGg anti-Toxoplasma humano con avidez alta, en la muestra diluida; en la etapa de pretratamiento para el ANÁLISIS Núm. 1, la sonda de pipeteado dispensa "Tampón de Pretratamiento 1 de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®", que contiene solamente tampón, en la muestra diluida; Las muestras pretratadas se incuban durante 7 minutos; la sonda de pipetado dispensa después 90 µl de "Diluyente Específico para el Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" y 50 µl de "Masa de Micropartículas de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" en 23 µl de la reacción de pretratamiento y las muestras se incuban durante 18 minutos; los anticuerpos anti-Toxoplasma humano de baja avidez se unen a la fase sólida recubierta con antígeno rpMBP-ToxoP30MIX1 en el ANÁLISIS núm. 2 mientras los anticuerpos IgG anti-Toxoplasma humano de alta y baja avidez se unen a la fase sólida recubierta con antígeno rpMBP-ToxoP30MIX1 en el ANÁLISIS núm. 1; después las micropartículas se lavan con Diluyente para la Línea ARCHITECT® y después la sonda de pipeteado dispensa 50 µl de la "Masa de Producto Conjugado de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" y las micropartículas se incuban con el producto conjugado durante 4 minutos; las micropartículas se lavan de nuevo con Diluyente para Línea ARCHITECT® y después se tratan con reactivo de Pre-sensibilización y de Sensibilización ARCHITECT®; la señal de quimioluminiscencia resultante generada es leída por el aparato ARCHITECT® y presentada como ULR

para cada muestra y almacenada para el ANÁLISIS Núm. 1 y el ANÁLISIS Núm. 2; después de completar la ronda, el aparato resta la ULR del "Calibrador de Fondo de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" de cada muestra para el ANÁLISIS Núm. 1 y el ANÁLISIS Núm. 2 y calcula el Índice de Avidez como se ha descrito más arriba; después del resultado del Índice de Avidez también se presenta la interpretación del resultado de acuerdo con el siguiente algoritmo; las muestras que tienen un valor del Índice de Avidez < 30% contienen IgG para Toxoplasma de baja avidez; ≥ 40% contienen IgG para Toxoplasma de alta avidez; y entre 30 y 39% son equívocas para la avidez del anticuerpo IgG para Toxoplasma.

EJEMPLO 8

Evaluación del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®
Etapa A: Sueros Humanos para el Ensayo

En esta evaluación se sometieron a ensayo dos grupos de sueros: el Grupo 1 (n = 138) consistió en individuos al azar de Francia que eran negativos para el anticuerpo IgG para Toxoplasmosis; el Grupo 2 (n = 23) consistió en muestras de sangre seriadas de dos individuos con toxoplasmosis aguda como se documentó por medio de seroconversión; el Grupo 3 (n = 24) consistió en individuos seleccionados que eran positivos para el anticuerpo IgG para Toxoplasmosis.

Etapa B: Comparación del Funcionamiento del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® con el Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma Vidas y Datos Clínicos

El análisis de avidez de IgG para Toxoplasma Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia) consiste en dos análisis de IgG para Toxoplasma realizados por duplicado y distingue entre especímenes que contienen avidez baja y alta mediante la incorporación de una etapa de lavado caotrópico con urea después de la incubación con anticuerpo primario en uno de los dos análisis de IgG para Toxoplasma. El Índice de Avidez para el análisis de avidez de IgG para Toxoplasma Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia) se calculó como sigue por medio del prospecto del paquete del fabricante utilizando el Valor de Fluorescencia Relativo (VFR):

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = \frac{\text{VFR del Ensayo con Reactivo de Disoc. (Urea)}}{\text{VFR de Referencia sin Reactivo de Disoc.}} \times 100$$

Los resultados para este análisis fueron interpretados de acuerdo con el prospecto del paquete Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia).

Las muestras del Grupo 1 (Toxoplasma IgM- IgG+) se utilizaron para evaluar la especificidad clínica del análisis de avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®. Las muestras que son negativas para IgM para Toxoplasma y positivas para anticuerpo IgG para Toxoplasma deben contener IgG de alta avidez ya que esta población es inmune a T. gondii y no tiene infección por T. gondii activa. Los resultados con las muestras del Grupo 1 se muestran más abajo en la Tabla 3:

TABLA 3

Evaluación del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® sobre Muestras del Grupo 1 (Toxoplasma IgG+ IgM-)			
Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®			
BAJA	EQV	ALTA	TOTAL
1	1	136	138
Especificidad Clínica ARCHITECT®: 136/137 = 99,3%			

Como se puede observar a partir de la Tabla 3, el análisis de avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® demuestra una elevada especificidad clínica, esto es, casi todas las muestras que fueron negativas para IgM para Toxoplasma y positivas para anticuerpo IgG para Toxoplasma contenían IgG para Toxoplasma de alta avidez.

Las muestras del Grupo 2 y el Grupo 3 se utilizaron para evaluar la concordancia y la correlación entre los análisis de avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® y Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia). Estas muestras fueron de individuos con toxoplasmosis aguda como se documentó mediante seroconversión y de individuos positivos para IgG para Toxoplasma seleccionados. Los resultados con las muestras del Grupo 2 y el Grupo 3 se muestran en la Tabla 4:

TABLA 4

Evaluación del Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® sobre Muestras del Grupo 2 y del Grupo 3					
		Avidez de IgG para Toxoplasma Vidas			
		BAJA	EQV	ALTA	TOTAL
Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®	BAJA	23	0	0	23
	EQV	0	0	0	0
	ALTA	0	1	23	24
	TOTAL	23	1	23	47
Concordancia relativa ARCHITECT®/Vidas: 46/46 = 100% Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia)					

Como se puede observar a partir de la Tabla 4, los análisis ARCHITECT® y Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia) concuerdan de manera excelente entre sí, esto es, las muestras con resultados de avidez baja y alta en el análisis ARCHITECT® también tienen resultados de avidez baja y alta correspondientes, respectivamente, en el análisis Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia). La correlación entre los resultados de los análisis de avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® y Vidas (BioMérieux SA, Lyon, Francia) se evaluó a través de las muestras de los Grupos 2 y 3 (n = 47) y se obtuvo un coeficiente de correlación r = 0,97. Este fue un resultado sorprendente e inesperado por dos razones: primero, los análisis de avidez son cualitativos y por consiguiente no cabría esperar necesariamente una concordancia cuantitativa; y segundo, utilizan formatos de análisis muy diferentes, esto es, el formato de antígeno competitivo separa selectivamente la IgG de alta avidez de la muestra del paciente mientras el formato caotrópico separa la IgG de baja avidez en una etapa de lavado.

Existen numerosas ventajas del formato de antígeno competitivo de la avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® sobre el formato caotrópico de otros análisis de avidez de IgG para Toxoplasma. Primero, no se requieren reactivos caotrópicos para realizar el análisis. Los reactivos caotrópicos pueden resultar peligrosos o corrosivos para una plataforma de un aparato de inmunoanálisis automático y también pueden contaminar de manera cruzada otros análisis ocasionando de ese modo resultados aberrantes. Segundo, se sabe que el Índice de Avidez resulta afectado en cierto modo por la concentración de anti-IgG humana contra un agente infeccioso (Hedman, K. y Seppala, I., *supra*). La mayor parte de los análisis de avidez convencionales que emplean reactivos caotrópicos no compensan este efecto mientras la presente invención utiliza una serie de protocolos de dilución para diluir las muestras en el intervalo apropiado, asegurando de este modo que el resultado del Índice de Avidez no es confundido por el título de anti-IgG presente en las muestras de los pacientes.

Dada la excelente concordancia entre el método caotrópico y el método del antígeno competitivo de la presente invención para la determinación de la avidez de los anticuerpos, son posibles aplicaciones adicionales de los métodos de la presente invención. Por ejemplo, además de para HCMV y para T. gondii, el método caotrópico ha sido útil para discriminar entre infecciones agudas e infecciones adquiridas en un pasado lejano para muchas enfermedades infecciosas. Se cree que el método del antígeno competitivo descrito en la presente memoria también podría ser útil a nivel diagnóstico para discriminar entre infección aguda y crónica para una variedad de enfermedades, incluyendo aquellas para las cuales no se ha descrito el método caotrópico. Además, el método del antígeno competitivo, como se demostró para HCMV, puede proporcionar un funcionamiento del análisis superior al del método caotrópico sin las desventajas y los riesgos concomitantes asociados con el uso de los reactivos caotrópicos.

EJEMPLO 9

Controles de Baja Avidez "Simulada" para CMV y Toxoplasma

Etapa A: Controles para el Ensayo

El "Control de Alta Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" descrito en el EJEMPLO 1 contiene IgG para CMV de alta avidez (índice de avidez de aprox. 90%) y título elevado (aprox. 200 UA/ml). El "Control de Alta Avidez de la IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" descrito en el EJEMPLO 1 contiene IgG para Toxoplasma de alta avidez (índice de avidez aprox. 70%) y título elevado (aprox. 700 UI/ml).

Etapa B: "Control de Baja Avidez de IgG para CMV Simulado"

El análisis de avidez de IgG para CMV ARCHITECT® descrito en el EJEMPLO 3 tiene cuatro protocolos de dilución automática: Protocolo de Dilución Núm. 1, 5-16 UA/ml; Protocolo de Dilución Núm. 2, 16-50 UA/ml; Protocolo de Dilución Núm. 3, 50-150 UA/ml; Protocolo de Dilución Núm. 4, 150-500 UA/ml. El "Control de Alta Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®", que contiene aprox. 200 UA/ml, se debería llevar a cabo normalmente en el Protocolo de Dilución Núm. 4 con el fin de obtener un resultado válido de avidez. Este control se lleva a cabo en los Protocolos de Dilución Núms. 1-4 con los siguientes resultados.

TABLA 5

Evaluación del Control de Alta Avidez de IgG para CMV ARCHITECT® a través de los Cuatro Protocolos de Dilución en el Análisis de Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®			
Núm. de Protocolo	Intervalo de Título (UA/ml)	Índice de Avidez (%)	Interpretación
1	5-16	30,5	Baja
2	>16-50	64,4	Alta
3	>50-150	80,2	Alta
4	>150-500	93,4	Alta

Como se puede observar a partir de la Tabla 5, el "Control de Alta Avidez de IgG para CMV ARCHITECT®" "imita" un control de IgG de baja avidez cuando se lleva a cabo incorrectamente en el Protocolo Núm. 1 en lugar del Protocolo de Dilución Núm. 4 correcto. El factor de dilución en el Protocolo Núm. 1 no fue suficiente para este control de alta avidez de elevado título, dando como resultado una IgG de título elevado que supera el "bloqueo" por el "antígeno en fase líquida", y de ese modo la unión al "antígeno en fase sólida". Por consiguiente, un control de baja avidez "simulado" de IgG para CMV se puede obtener simplemente llevando a cabo el control de alta afinidad en un protocolo de dilución que "infra-diluye" el control de tal manera que produce la unión de la IgG de alta avidez al "antígeno en fase sólida" y registrando de ese modo un resultado de IgG de baja avidez en el análisis.

Etapa C: "Control de Baja Avidez de IgG para Toxoplasma Simulado"

El análisis de avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® descrito en el EJEMPLO 7 tiene tres protocolos de dilución automática: Protocolo de Dilución Núm. 1, 3-20 UI/ml; Protocolo de Dilución Núm. 2, 21-200 UI/ml; Protocolo de Dilución Núm. 3, 201-2000 UI/ml. El "Control de Alta Avidez para Toxoplasma ARCHITECT®", que contiene aprox. 700 UI/ml, se debería llevar a cabo normalmente en el Protocolo de Dilución Núm. 3 con el fin de obtener un resultado válido de avidez. Este control se llevó en Protocolos de Dilución Núms. 1-3 con los siguientes resultados.

TABLA 6

Evaluación del Control de Alta Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® A través de los Cuatro Protocolos de Dilución en el Análisis de Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®			
Núm. de Protocolo	Intervalo de Título (UI/ml)	Índice de Avidez (%)	Interpretación
1	3-20	0,7	Baja
2	>20-200	11,9	Baja
3	>200-2000	65,1	Alta

Como se puede observar a partir de la Tabla 6, el "Control de Alta Avidez de IgG para Toxoplasma ARCHITECT®" "imita" un control de IgG de baja avidez cuando se lleva a cabo incorrectamente en el Protocolo Núm. 1 en lugar del Protocolo de Dilución Núm. 3 correcto. El factor de dilución del Protocolo Núm. 1 no fue suficiente para este control de alta avidez de título elevado, dando como resultado una IgG de título elevado que supera el "bloqueo" por el "antígeno en fase líquida", y se une de ese modo al "antígeno en fase sólida". Por consiguiente, un control de baja avidez "simulado" para la IgG de Toxoplasma se puede obtener simplemente llevando a cabo el control de alta avidez en un protocolo de dilución que "infra-diluye" el control de tal manera que da como resultado la unión de la IgG de alta avidez al "antígeno en fase sólida" y registra de ese modo un resultado de IgG de baja avidez en el análisis.

El método caotrópico no puede utilizar controles de avidez "simulados". De este modo, se cree que el análisis de avidez de antígenos competitivo de la presente invención tiene varias ventajas diferentes sobre el método

caotrópico. Primero, el plasma con IgG de alta avidez es relativamente fácil de originar asegurando de este modo que los controles del análisis de IgG de baja avidez "simulados" estarán disponibles para controlar la validez del análisis de avidez. Segundo, será más fácil desarrollar un análisis de avidez para enfermedades infecciosas conocidas y nuevas utilizando el formato de antígeno competitivo que el formato caotrópico, especialmente en los casos en los que la seroprevalencia y la incidencia de la enfermedad son bajas, esto es, los casos en los que las muestras de IgG de baja avidez de los pacientes o el plasma para la enfermedad de interés no se encuentran disponibles o son peligrosos para los individuos que desarrollan nuevos ensayos de avidez. El rápido desarrollo de los ensayos de diagnóstico para los patógenos de reciente emergencia, especialmente el análisis de avidez, se puede utilizar como ayuda para diagnosticar, tratar, y poner en cuarentena individuos en fase aguda de la enfermedad que pueden transmitir fácilmente la infección a individuos no infectados previamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación de la proporción de anticuerpo IgG de baja avidez anti-agente infeccioso humano en una muestra del paciente, sospechoso dicho paciente de haber sido infectado por un agente infeccioso, que comprende las etapas de:

a) añadir al menos un antígeno aislado de dicho agente infeccioso a una disolución para crear un antígeno en fase líquida y recubrir con dicho al menos un antígeno aislado una fase sólida para crear un antígeno en fase sólida;
b) en un primer análisis, poner en contacto una muestra de ensayo de dicho paciente con una fase líquida que no comprende el antígeno infeccioso y después con dicha fase sólida recubierta de la etapa a) durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de alta y baja avidez a dicha fase sólida;
c) lavar dicha fase sólida recubierta de la etapa b);
d) en un segundo análisis, poner en contacto una muestra de ensayo de dicho paciente con dicho antígeno en fase líquida, esto es dicho antígeno en disolución y después con dicho antígeno en fase sólida durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno para unir la IgG de baja avidez a dicha fase sólida;
e) lavar dicho antígeno en fase sólida puesto en contacto de la etapa d);
f) añadir un producto conjugado a dichos primer y segundo análisis durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la formación de complejos anti-IgG/anticuerpo/antígeno en dichos primer y segundo análisis, donde dicho producto conjugado comprende un anticuerpo anti-IgG anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable;
g) detectar una señal generada por dicho compuesto generador de señal en dichos primer y segundo análisis;
h) determinar la razón entre dicha señal obtenida en dicho segundo análisis y dicha señal obtenida en dicho primer análisis, donde dicha razón representa la proporción de anticuerpo IgG de baja avidez anti-agente infeccioso humano presente en dicha muestra del paciente; e
i) multiplicar dicha razón de la etapa h) por 100 y restar dicha razón multiplicada de 100 con el fin de determinar el Índice de Avidez.

2. El método de la reivindicación 1, donde dicho agente infeccioso se selecciona del grupo que consiste en un virus, un parásito, un hongo y una bacteria.

3. El método de la reivindicación 1, donde dicha muestra del paciente se pretrata con una disolución antes de la adición de dicha fase sólida recubierta.

4. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha fase sólida se selecciona del grupo que consiste en un material poroso, un material no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula, una cuenta, una membrana, y un pocillo de microtitulación y un tubo de plástico.

5. El método de la reivindicación 1, donde el agente infeccioso es *Toxoplasma gondii (T. gondii).*

6. El método de la reivindicación 5, donde un Índice de avidez <20% indica que dicho paciente tiene una IgG para Toxoplasma de baja avidez, un Índice de avidez ≥50% indica que dicho paciente tiene una IgG para Toxoplasma de alta avidez, y un Índice de avidez entre 20% y 49% indica que dicho paciente es equívoco para la avidez del anticuerpo IgG para Toxoplasma.

7. El método de la reivindicación 5, donde un Índice de avidez < 30% indica que dicho paciente tiene una IgG para Toxoplasma de baja avidez, un Índice de avidez ≥ 40% indica que dicho paciente tiene una IgG para Toxoplasma de alta avidez, y un Índice de avidez entre 30% y 39% indica que dicho paciente es equívoco para la avidez del anticuerpo IgG para Toxoplasma.

8. El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde un resultado de IgG para Toxoplasma de baja avidez indica que dicho paciente puede tener o no toxoplasmosis aguda y un resultado de IgG para Toxoplasma de alta avidez indica que dicho paciente no ha tenido toxoplasmosis aguda en los aproximadamente 4 meses previos al ensayo.

9. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde dicho al menos un antígeno aislado de *Toxoplasma gondii* se selecciona del grupo que consiste en P22, P24, P25, P28, P29, P30, P35, P41, P54, P66 y P68.

10. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde dicha muestra del paciente se pretrata con una disolución antes de la adición de dicha fase sólida recubierta.

11. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, donde dicha fase sólida se selecciona del grupo que consiste en un material poroso, un material no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula, una cuenta, una membrana, un pocillo de microtitulación y un tubo de plástico.

12. El método de la reivindicación 1, donde el agente infeccioso es el citomegalovirus humano (HCMV).

13. El método de la reivindicación 12, donde un Índice de avidez < 40% indica que dicho paciente tiene una IgG para CMV de baja avidez, un Índice de avidez ≥ 70% indica que dicho paciente tiene una IgG para CMV de alta avidez, y un Índice de avidez entre 40% y 69% indica que dicho paciente es equívoco para la avidez del anticuerpo IgG para CMV.

14. El método de la reivindicación 12, donde un Índice de avidez < 50% indica que dicho paciente tiene una IgG para CMV de baja avidez, un Índice de avidez ≥ 60% indica que dicho paciente tiene una IgG para CMV de alta avidez, y un Índice de avidez entre 50% y 59% indica que dicho paciente es equívoco para la avidez del anticuerpo IgG para CMV.

15. El método de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, donde un resultado de IgG de baja avidez para CMV indica que dicho paciente tiene una infección por CMV primaria y un resultado de IgG de alta avidez para CMV indica que dicho paciente tiene una infección por CMV no primaria.

16. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde dicho al menos un antígeno aislado de citomegalovirus humano se selecciona del grupo que consiste en pp38, pp53, pp65, p130 y pp150.

17. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde dicha muestra del paciente se pretrata con una disolución antes de la adición de dicha fase sólida recubierta.

18. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, donde dicha fase sólida se selecciona del grupo que consiste en un material poroso, un material no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula, una cuenta, una membrana, un pocillo de microtitulación y un tubo de plástico.

Muestra de Paciente IgG+ IgM+ para CMV

↓

Selección del Protocolo de Dilución basado en el título de IgG para CMV ARCHITECT® (UA/ml)

↙ ↘

Análisis Núm. 1
Pretratamiento de la Muestra con Tampón

Análisis Núm. 2
Pretratamiento de la Muestra Con Antígeno de CMV (Antígeno en Fase Líquida)

↓ ↓

Incubar con Micropartículas Recubiertas con Antígeno de CMV (Antígeno en Fase Sólida)

↓ ↓

Lavar las Micropartículas

↓ ↓

Eliminación de IgG para CMV de Alta Avidez

Análisis Núm. 1:
IgG para CMV de Alta y Baja Avidez Unida a Antígeno en Fase Sólida

Análisis Núm. 2
IgG para CMV de Baja Avidez Unida a Antígeno en Fase Sólida

↓ ↓

Incubar con Producto Conjugado anti-IgG humana de ratón marcada con acridinio

↓ ↓

Lavado y Adición de Pre-sensibilización y Sensibilización para la Generación de la Señal

↘ ↙

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{ULR de la Muestra – URL del Calibrador (Análisis Núm. 2)}}{\text{ULR de la Muestra – ULR del calibrador (Análisis Núm. 1)}} \right) \times 100$$

Figura 1

Muestra de Paciente IgG+ IgM+ para Toxoplasma

↓

Selección del Protocolo de Dilución basado en el título de IgG para Toxoplasma ARCHITECT® (UI/ml)

↙ ↘

Análisis Núm. 1
Pretratamiento de la Muestra con Tampón

Análisis Núm. 2
Pretratamiento de la Muestra Con Antígeno para Toxoplasma (Antígeno en Fase Líquida)

↓ ↓

Incubar con Micropartículas Recubiertas con Antígeno para Toxoplasma (Antígeno en Fase Sólida)

↓ ↓

Lavar las Micropartículas

↓ ↓

Eliminación de IgG para Toxoplasma de Alta Avidez

Análisis Núm. 1:
IgG para Toxoplasma de Alta y Baja Avidez Unida a Antígeno en Fase Sólida

Análisis Núm. 2
IgG para Toxoplasma de Baja Avidez Unida a Antígeno en Fase Sólida

↓ ↓

Incubar con Producto Conjugado anti-IgG humana de ratón marcada con acridinio

↓ ↓

Lavado y Adición de Pre-sensibilización y Sensibilización para la Generación de la Señal

↘ ↙

$$\text{Índice de Avidez (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{ULR de la Muestra – RLU del Calibrador (Análisis Núm. 2)}}{\text{ULR de la Muestra – RLU del calibrador (Análisis Núm. 1)}} \right) \times 100$$

Figura 2