

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 933**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05793374 .9**
96 Fecha de presentación: **29.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1774336**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **MÉTODO DE DETERMINACIÓN DEL ESTATUS VACUNAL DE PERSONAS.**

30 Prioridad:
03.08.2004 FR 0408600

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

73 Titular/es:
INODIAG
Parc d'activités 19 allée d'Athènes
83870 Signes, FR

72 Inventor/es:
ESCARGUEL, Claude

74 Agente: **Curell Aguila, Marcelino**

ES 2 368 933 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de determinación del estatus vacunal de personas.

5 La presente invención se refiere a un método y a un equipo de diagnóstico para la determinación serológica del estatus vacunal de personas. La vacunación consiste en introducir por una vía de administración apropiada uno o varios antígenos de un agente patógeno bacteriano, vírico o parasitario, eventualmente asociado a una o varias sustancias que estimula(n) la respuesta inmunitaria contra este(os) antígeno(s) (adyuvantes vacunales).

10 Sea cual sea el modo de vacunación, el objetivo es la implantación en la persona vacunada de una respuesta inmunitaria específica del patógeno que comprende una inmunidad de memoria, es decir susceptible de responder en algunas horas a una nueva introducción del patógeno protegiendo así eficazmente a la persona contra el patógeno. Una modalidad particular y esencial de la inmunidad conferida por la vacunación es la producción de anticuerpos específicos del antígeno vacunal.

15 La protección conferida por la vacunación no es permanente, y es adquirida sólo durante un lapso de tiempo comprendido entre algunos meses y algunos decenios. En efecto, el patógeno contra el cual se realiza la vacunación puede presentar unas modificaciones periódicas de su composición antigénica que hace parcial o completamente caduca la protección conferida por la vacunación con la composición antigénica anterior. Asimismo, la prevalencia
20 relativa de diferentes variantes antigénicas (serotipos) del patógeno en función del tiempo y del país considerado, obliga a modificar la composición de la vacuna para incorporar en ella los antígenos de los serotipos nuevamente prevalentes. Esto se ilustra mediante las recomendaciones vacunales elaboradas específicamente para los viajeros que van a países de fuerte endemia de estos patógenos [Mackell SM. Vaccinations for the pédiatrie traveler. Clin. Infect. Dis. 2003, 37:1508-1515; Kirkpatrick B.D & Kemper Alston W. Current immunization for travel. Current
25 Opinion in Infections Diseases 2003,16: 369-374]. Por otra parte, la duración de vida de los anticuerpos protectores inducidos por la vacuna está limitada a algunos años en ausencia de nueva estimulación antigénica por contacto con el patógeno, o por una nueva vacunación. Asimismo, la respuesta individual puede variar según el estado inmunitario en el momento de la vacunación y según la vía de administración. Estas tres razones, modificaciones antigénicas del patógeno, desaparición progresiva de los anticuerpos protectores específicos y heterogeneidad de
30 respuesta, imponen una re-vacunación de las personas en forma de recuerdos vacunales.

La vacunación y la administración de un recuerdo vacunal se pueden analizar teniendo en cuenta los efectos secundarios conocidos de ciertas vacunas, un análisis coste/beneficio, y la selección libre de la persona para las vacunas que no son obligatorias en el ámbito de las recomendaciones publicadas en forma de calendario vacunal
35 que precisa las modalidades de administración de la vacuna y de los eventuales recuerdos de ésta [anónimo - Calendario vacunal 2003, Avis du Conseil Supérieur d'hygiène publique de France. Bulletin Epidémiologique hebdomadaire 2003, 6:33-36]. En efecto, la actitud del recuerdo vacunal sistemático de la población es cada vez más cuestionada debido a los análisis coste-beneficio y la presión de la opinión pública. Una decisión de recuerdo vacunal adaptado individualmente al estatus inmunitario de la persona es por lo tanto deseable. En efecto, el coste
40 de la vacunación es una apuesta considerable no sólo para los países industrializados sino sobre todo para los países en desarrollo (PED) [Carabin H & Edmunds WJ. Future savings form measles eradication in industrialized countries. J. Infect. Dis. 2003,187 (supl. 1): 529-535].

45 La determinación en el suero de la persona a vacunar de la presencia, incluso del porcentaje de anticuerpos protectores específicos, debería ser un elemento clave para decidir la administración de la vacuna o del recuerdo vacunal. En efecto, si el suero de la persona contiene unos anticuerpos específicos del patógeno en una concentración protectora, no existe ningún beneficio, sino todo lo contrario, un riesgo de administrar un recuerdo vacunal a esta persona.

50 La búsqueda de la presencia de anticuerpos de clase IgG específicos se realiza actualmente en los laboratorios para los virus del sarampión, de las paperas y de la rubéola. La determinación en laboratorio de la concentración de anticuerpos específicos se realiza sólo para el virus B de la hepatitis: un porcentaje de anticuerpos anti HBs > 10 mUI/ml se considera como protector contra la infección por el virus B de la hepatitis y no justifica un recuerdo vacunal. Para la detección de los anticuerpos antitetánicos (dirigida contra la toxina tetánica), se han desarrollado
55 algunos ensayos rápidos basados en una técnica de hemaglutinación pasiva (Vacci-test[®] Pasteur[®]) o en la inmunocromatografía para mejorar la atención de heridos.

En los métodos propuestos actualmente, la detección de la presencia o la medición de la concentración de los anticuerpos dirigidos específicamente contra los diferentes antígenos vacunales se realizan separadamente entre sí.
60 Por lo tanto, se necesita realizar varias extracciones de suero que se analizarán separadamente, llegado el caso, en varios laboratorios que disponen cada uno de una capacidad de análisis de un solo antígeno vacunal o de un número restringido de antígenos vacunales.

65 Algunos estudios mencionan la determinación de una parte del estatus vacunal de la persona. Por ejemplo, un estudio de seroprevalencia contra los virus de las paperas, del sarampión, de la rubéola y de la varicela se ha realizado en personal sanitario en Japón en el ámbito de un programa vacunal contra estos patógenos [Asari S. et

5 *al. Seroprevalence survey of measles, rubella, varicella and mumps antibodies in health care workers and evaluation of a vaccination program in a tertiary care hospital in Japan; Am. J. Infect. Control. 2003, 31:157-162].* En este trabajo, se ha realizado una única extracción de sangre, pero los cuatro ensayos serológicos, a pesar de ser realizados por el mismo laboratorio, fueron realizados utilizando placas de microtitulación diferentes sobre cada una de las cuales se fijaba un antígeno de un solo agente patógeno y según unos métodos diferentes. Los métodos ELISA utilizados no permitían determinar el título de los anticuerpos específicos ensayados. Los métodos ELISA utilizados implicaban, además, teniendo en cuenta la naturaleza del soporte sólido utilizado, la extracción y el análisis sobre muestras de volumen relativamente importante de suero, a saber un volumen necesario para llenar varios pocillos de microplacas. Este trabajo no ha permitido determinar una seroconversión contra los antígenos específicos después de una vacunación en 20% de las personas vacunadas contra el sarampión y contra la rubéola y en 50% de las personas vacunadas contra las paperas, imputable a una sensibilidad mediocre de los métodos de detección utilizados. Los diferentes métodos propuestos para la determinación del estatus vacunal implican frecuentemente unos plazos de respuesta para obtener los resultados superiores a 24 horas y, en general, con una sensibilidad y por lo tanto una fiabilidad mediocres.

15 No existe actualmente ningún equipo, ningún ensayo automatizado y reproducible, que permita la determinación del estatus vacunal de una persona mediante la determinación del título de anticuerpos específicos contra los principales patógenos vacunales. Así, no se proporciona actualmente ningún método ni kit que permitan determinar en un plazo de tiempo inferior a 24 horas sobre una sola extracción de suero, el estatus vacunal de una persona, es decir la detección o la determinación de las concentraciones de anticuerpos de clase IgG específicos en relación con el conjunto de las vacunas actualmente disponibles.

20 El objetivo de la presente invención es proporcionar una técnica de determinación del estatus vacunal de una persona que sea simple, rápido y poco costoso, que se pueda utilizar en particular por cualquier laboratorio para conocer simultáneamente mediante análisis de una misma muestra de suero a ensayar, la concentración de anticuerpos contra una pluralidad de vacunas actualmente disponibles, en un volumen de muestras relativamente reducido y por lo tanto compatible para unas extracciones en el niño, incluyendo el lactante.

25 Más particularmente aún, la técnica de diagnóstico debe poder ser automatizable y reproducible de manera fiable, tanto en su utilización como en la preparación de los soportes sólidos utilizados.

30 Con este fin, la presente invención proporciona un método de determinación serológica del estatus vacunal de un individuo mediante la detección y cuantificación de los anticuerpos séricos de tipo IgG específicos de antígenos vacunales de una pluralidad de agentes patógenos de tipo bacterias, virus, hongos o parásitos, caracterizado porque se realiza la detección y la cuantificación de un complejo de reacciones inmunológicas entre cada antígeno vacunal y respectivamente cada anticuerpo específico de tipo IgG de dicho antígeno vacunal, eventualmente presentes en una muestra de suero humano a ensayar, realizando las etapas de:

35 1- poner en contacto una sola y misma muestra de suero a ensayar con:

- 40
- un mismo soporte sólido en el que se fija una pluralidad de dichos antígenos vacunales que corresponden a una pluralidad de agentes patógenos diferentes, preferentemente por lo menos 3, más preferentemente por lo menos 4 antígenos vacunales de agentes patógenos diferentes, en unas zonas diferentes del soporte,
 - 45 - en presencia de por lo menos una sustancia de detección que reacciona mediante complejación con dichos anticuerpos específicos de tipo IgG y que no reacciona con dichos antígenos vacunales, y

50 2- determinar la concentración en dichos anticuerpos específicos de tipo IgG mediante cuantificación de los complejos que resultan de la reacción de por lo menos dicha sustancia de detección con dichos anticuerpos específicos de tipo IgG complejados a dichos antígenos vacunales fijados sobre dicho soporte sólido.

55 Después del lavado del soporte sólido, se verifica la presencia de dichos anticuerpos específicos en la muestra detectando la señal del elemento de marcado de dicha sustancia de detección a nivel del sitio de fijación del antígeno vacunal que corresponde a dicho anticuerpo específico sobre el soporte sólido, en la medida en la que dicha sustancia de detección reacciona específicamente con dicho anticuerpo específico y no reacciona con dicho antígeno vacunal.

Típicamente, dicha sustancia de detección es un anticuerpo secundario de origen animal.

60 En un modo de realización preferido, dicha sustancia de detección comprende un marcado fluorescente.

65 La expresión "marcado fluorescente" significa que la sustancia de detección, en particular el anticuerpo secundario de detección se ha vuelto fluorescente mediante acoplamiento o complejación con una sustancia fluorescente apropiada tal como el iso(tio)cianato de fluoresceína, a saber una sustancia que emite una radiación detectable después de su iluminación, estando cada sustancia fluorescente caracterizada por la longitud de onda a la que se debe ser iluminada (longitud de onda de excitación) y la longitud de onda de la radiación que emite (longitud de onda

de emisión).

Como sustancia fluorescente de marcado, se puede citar en particular la fluoresceína, la cumarina, la cianina y los análogos y derivados de estas sustancias conocidas por el experto en la materia.

5 La cuantificación se realiza mediante la comparación de la señal fluorescente emitida por el complejo de reacción [antígeno-anticuerpo específico-sustancia de detección] del suero ensayado con una curva de referencia obtenida mediante calibrado con la ayuda de sueros de control que contienen una concentración de anticuerpos a detectar.

10 Cuando se utiliza una sustancia fluorescente, la fluorescencia asociada a la muestra ensayada se lee directamente en un aparato apropiado capaz de detectar la radiación a la longitud de onda de emisión y de cuantificarla.

Dichos aparatos son conocidos por el experto en la materia.

15 El marcado fluorescente es particularmente ventajoso en el caso de determinación del estatus vacunal en la medida en la que es esencial obtener una cuantificación precisa y fiable a la concentración en dichos anticuerpos específicos de tipo IgG, lo cual se puede obtener gracias a las señales fluorescentes cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de moléculas fluorescentes que emiten la señal.

20 Se entiende por "antígeno vacunal" un antígeno susceptible de estimular una respuesta inmunitaria del paciente que induce la producción de anticuerpos séricos protectores, es decir un anticuerpo que se une al agente patógeno de tal manera que el organismo se encuentra así protegido contra los efectos patógenos de dicho agente.

25 Ventajosamente, se determina si la concentración de dicho anticuerpo específico alcanza un umbral determinado a partir del cual dicho anticuerpo específico de tipo IgG tiene una acción protectora que protege contra la enfermedad determinada por el patógeno.

30 En algunos casos, es posible en efecto determinar una concentración de anticuerpos específicos que confieren una protección en cerca de 100% de las personas vacunadas, realizándose la determinación de esta concentración (o umbral) mediante unos estudios sero-epidemiológicos sobre amplias poblaciones.

35 En un modo preferido de realización, dichos antígenos vacunales comprenden por lo menos 3, preferentemente de 3 a 12 antígenos vacunales de agentes patógenos seleccionados de entre los virus de las paperas, de la rubéola, del sarampión, de la varicela, de la poliomielitis, de la fiebre amarilla, de la encefalitis por garrapata, de la hepatitis A, de la hepatitis B y de las bacterias de la tos ferina *Bordetella pertussis*, del tétanos y de la difteria.

Preferentemente, en el método según la invención, se utiliza una misma sustancia de detección para la detección de los diferentes anticuerpos específicos de los diferentes antígenos vacunales.

40 Más preferentemente, y más particularmente, se utiliza una sustancia de detección que es una inmunoglobulina anti-IgG, preferentemente una inmunoglobulina de cabra o de pollo.

45 La presente invención se refiere por lo tanto más particularmente a un método de diagnóstico del estatus vacunal de las enfermedades infecciosas humanas, pero indirecto, que se basa en la búsqueda y la cuantificación en el suero del paciente de anticuerpos específicos de un agente vacunal del agente microbiano infeccioso, a saber una bacteria, un virus, un parásito o un hongo responsable de una patología (designados a continuación "microbio").

50 Este método según la invención es más particularmente ventajoso cuando por lo menos un antígeno vacunal es un antígeno microbiano corpuscular constituido por microbio entero inactivado o fracción de microbio, en particular un antígeno vacunal en forma de suspensión vírica de virus enteros vivos desactivados.

55 Los inventores han desarrollado en efecto una tecnología mediante la cual este tipo de antígeno particulado o corpuscular puede ser fijado en el soporte sólido mediante simple depósito y adsorción física o unión físico-química con el soporte mediante un método de preparación de soporte sólido según la invención, tal como se explicará a continuación. Estos antígenos particulados o corpusculares tienen la ventaja de ser particularmente bien visibles después del depósito sobre el soporte sólido y, en particular, durante la lectura de detección de reacciones inmunológicas eventuales.

60 Por lo tanto, se utilizan ventajosamente, como antígenos vacunales, unos antígenos constituidos por microbios enteros inactivados o por fracciones o fragmentos de microbios que comprenden uno o varios antígenos. En efecto, es posible fragmentar mecánicamente el microbio mediante agitación mecánica o mediante sonicación por ejemplo o también fragmentar el microbio mediante un procedimiento enzimático con el fin de obtener una fracción que conserva los antígenos que soportan la reacción serológica, objeto de la presente invención. Las fracciones así obtenidas son separadas o también purificadas de los demás constituyentes del microbio y de su medio de cultivo mediante un procedimiento apropiado, por ejemplo mediante centrifugación o mediante filtración. Se habla entonces de fracción antigénica o de antígeno purificado. El microbio entero o cualquier fracción del microbio se denomina a

continuación "antígeno particulado o corpuscular" debido a que el microbio entero o una de sus fracciones no se puede poner en solución mediante disolución, sino únicamente en suspensión en un fluido apropiado.

5 Los microbios o su fracción así depositados son notablemente visibles claramente como partículas individualizadas por observación microscópica con la ayuda de un microscopio óptico o de un microscopio electrónico por ejemplo.

10 Técnicamente, la serología microbiana consiste en detectar en el suero del paciente una reacción antígeno-anticuerpo en la que el antígeno está representado mediante la totalidad o una fracción del agente microbiano infeccioso a detectar y el anticuerpo está representado mediante las inmunoglobulinas humanas o animales específicas de dicho agente microbiano infeccioso presentes en el suero del paciente. Se puede cuantificar ensayando sucesivamente una serie de diluciones crecientes de razón 2 o de razón 10 del suero del paciente a partir de una primera dilución al 1/16 o al 1/50 del suero del paciente.

15 Clásicamente, un método de diagnóstico serológico indirecto comprende más particularmente el depósito del antígeno sobre un soporte sólido tal como unas microbolas de látex, en particular en la técnica de detección por aglutinación en la que unas microbolas de látex son recubiertas por el antígeno microbiano a ensayar, y son aglutinadas entre sí por el suero del paciente que presenta unos anticuerpos específicos, siendo esta aglutinación apreciable a simple vista.

20 Sin embargo, la técnica de detección mediante ensayo de aglutinación es a la vez poco práctica de realizar y poco sensible. Implica, además, la utilización de cantidades importantes de agentes reactivos y del suero del paciente y, finalmente, la lectura de los resultados no es automatizable.

25 Según el método de la invención, se deposita por lo tanto, llegado el caso, el antígeno sobre un soporte sólido de tipo lámina de vidrio, o microplaca de titulación para realizar unas técnicas de detección mediante inmunodetección, preferentemente inmunofluorescencia. Estas técnicas de detección son bien conocidas por el experto en la materia y comprenden las etapas sucesivas siguientes:

- 30 1. descomplementar el suero mediante calentamiento a 56°C durante 30 minutos,
2. poner en contacto el antígeno que corresponde al agente microbiano infeccioso fijado en un soporte sólido, con el suero del paciente y después incubar bajo unas condiciones de tiempo, de temperatura, de higrometría, de agitación mecánica y de fuerza iónica del medio que permiten la reacción antígeno-anticuerpo,
- 35 3. lavar cuidadosamente y de forma extensiva de manera que permita eliminar el suero del paciente no fijado al soporte sólido, en exceso,
- 40 4. aplicar un anticuerpo secundario de detección que es una inmunoglobulina animal dirigida contra las inmunoglobulinas de la especie del paciente considerado, por ejemplo en el caso de un paciente humano una inmunoglobulina de cabra anti-inmunoglobulina humana conjugada con una sustancia fluorocroma, generalmente iso-tio-cianato de fluoresceína e incubar bajo unas condiciones de tiempo, de temperatura, de higrometría, de agitación mecánica y de fuerza iónica del medio que permiten la reacción antígeno-anticuerpo,
- 45 5. lavar cuidadosamente y de forma extensiva de manera que permita eliminar la inmunoglobulina marcada, no fijada, en exceso,
- 50 6. detectar una reacción mediante lectura, con la ayuda de un aparato apropiado en función del marcador tal como un microscopio de fluorescencia o un lector de chips biológicos (microarray en inglés) para la técnica de inmunofluorescencia indirecta, conocida por el experto en la materia.

55 Ventajosamente, se utiliza una sustancia de detección que es un anticuerpo secundario de detección, una inmunoglobulina animal dirigida contra las inmunoglobulinas de la especie del paciente considerado, por ejemplo en el caso de un paciente humano una inmunoglobulina de cabra anti-inmunoglobulina humana anti IgG humanas que reaccionan con las inmunoglobulinas específicas de clase G complejadas con dicho antígeno vacunal.

60 Ningún ensayo serológico comercializado actualmente incluye sistemáticamente el control de la introducción y del valor reactivo (o reactividad inmunológica) de los anticuerpos secundarios de detección anti IgG utilizados, y otro objetivo original de la presente invención es por lo tanto proporcionar un ensayo que comprende este control de reactividad.

65 Preferentemente, en el método según la invención, se realiza previamente el control de la presencia y de la reactividad de dicha primera sustancia de detección realizando las etapas siguientes:

- poner en contacto dicha muestra a ensayar con un mismo soporte sólido, en el que se ha fijado además un primer antígeno de control que es una inmunoglobulina no específica de clase G, en presencia de una disolución que contiene dicha primera sustancia de detección, y

- verificar si dicha sustancia de detección ha reaccionado con dicho primer antígeno de control fijado sobre dicho soporte sólido.

5 La especificidad de la reacción antígeno infeccioso/anticuerpo sérico condiciona la especificidad y el valor predictivo positivo del ensayo serológico basado en esta reacción y cualquier fijación de un anticuerpo no específico sobre el antígeno microbiano limita la especificidad y el valor predictivo del ensayo serológico. La presencia en el suero a ensayar de anticuerpos antinucleares, es una fuente de fijación no específica de anticuerpos sobre el antígeno microbiano tal como se explica a continuación.

10 La presencia en el suero del paciente de anticuerpos antinucleares limita la especificidad de la reacción antígeno microbiano-anticuerpos séricos. Los anticuerpos anti-nucleares son en efecto unos anticuerpos de tipo IgG dirigidos de manera no específica contra el conjunto formado por el ADN y las proteínas nucleares del cromosoma de las células eucariotas y de los microbios, denominadas histonas. Estos anticuerpos anti-nucleares se fijan por lo tanto de manera no específica sobre cualquier célula eucariota incluyendo los hongos y los parásitos y sobre cualquier microbio, bacterias, virus de ADN, parásito u hongo. Este fenómeno provoca una reacción positiva no específica durante los ensayos serológicos que utilizan la detección de IgG específica de una bacteria, un virus de ADN, un hongo o un parásito entero o que comprende unos complejos ADN/histonas como antígeno microbiano con la ayuda de anticuerpos de detección anti IgG en un suero que contiene unos anticuerpos anti-nucleares.

20 Se ha descrito la detección de los anticuerpos anti-nucleares en el suero a ensayar, realizada utilizando una técnica de inmunodetección por inmunofluorescencia [Fritzler M.J. en: Manual of Clinical Laboratory Immunology, Cuarta edición, Rose N.R., Conway de Macario E., Fahey J.L., Friedman H., Penn, G.M., (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992, p. 724-729] utilizando unas células de mamíferos incluyendo unas células humanas tales como unas células Hep-2 como antígeno. En estas condiciones, la prevalencia de los anticuerpos antinucleares detectados sobre el suero puro es de 2% en la población general, de 20% entre los parientes de pacientes que presentan una poliartritis reumatoide, y de 75% entre las personas mayores sin patologías clínicas aparentes [Mc Carty G.A., *et al.* Antinuclear antibodies: contemporary techniques and clinical applications to connective tissue diseases. Oxford University Press, Nueva York, 1984]. En este método, las células están constituidas por un tapiz de células confluentes depositadas y "leídas" manualmente. Este depósito de células confluentes es demasiado viscoso para ser robotizable por depósito con un robot de tipo jeringa, y la lectura no es automatizable puesto que, solo, el depósito manual permite depositar una gran cantidad de células de manera que garantice una detección suficiente de la reacción célula-anticuerpos anti-nucleares. En estas publicaciones, no se menciona la necesidad de realizar un control sistemático de la presencia de anticuerpos antinucleares en unos ensayos de inmunodetección de antígenos microbianos. Además, la detección con unas células confluentes depositadas manualmente sobre un soporte sólido no se puede aplicar para unos ensayos de rutina de laboratorio.

35 Por lo tanto, no existe ningún método publicado en la actualidad para el control o la eliminación de los anticuerpos antinucleares antes de la realización de un ensayo serológico para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas de manera que garantice durante el resultado la ausencia de una reacción falsamente positiva aplicable en rutina de laboratorio. Es por eso que ningún protocolo de serología publicado en los manuales de referencia ni ningún ensayo serológico comercializado incluye sistemáticamente la detección de anticuerpos antinucleares previa a la reacción o a la interpretación de la serología.

40 En la práctica, en la actualidad, en los ensayos de inmunodetección en rutina de laboratorio, se puede, como mucho, detectar los falsos positivos que se deben a la presencia de anticuerpos antinucleares sólo efectuando unos ensayos sobre una pluralidad de antígenos microbianos cuya presencia concomitante no es aparente. Pero, este sistema de verificación, se entiende, aumenta considerablemente el coste en términos de material y de mano de obra así como la duración de los ensayos.

50 Con este fin, la presente invención proporciona un método en el que se controla la presencia eventual de un anticuerpo antinuclear en dicha muestra a ensayar

- poniendo en contacto dicha muestra a ensayar con
 - * un soporte sólido en el que se ha fijado un segundo antígeno de control que comprende unos complejos ADN/histonas, preferentemente que comprende unos núcleos de células nucleadas de células de la especie del paciente, más preferentemente la totalidad o parte de células de origen de la especie del paciente en línea continua, y
 - * en presencia de una sustancia de detección constituida por un anticuerpo de marcado que reacciona sólo con una inmunoglobulina de la especie del paciente de clase G; y
- verificando si dicho segundo antígeno de control fijado en el soporte sólido reacciona con dicha sustancia de detección.

En el caso de un paciente humano, se puede utilizar en particular unas células de fibroblastos humanos con confluentes en suspensión, en particular unas células HL60.

5 Si la muestra a ensayar comprende unos anticuerpos antinucleares (que son unas IgG, en particular humanas), éstos pueden reaccionar con dicho segundo antígeno (Ag_2) y ser detectados por dicha sustancia de detección (Ac_1 anti IgG*) puesto que ésta es una sustancia que reacciona con unas IgG de la especie del paciente, en particular humanas, y formar el complejo (S- Ag_2 -IgG anti Ag_2 - Ac_1 anti IgG*).

10 Una vez establecida la ausencia de anticuerpos antinucleares, la detección de una reacción de dicha sustancia de detección con dicho antígeno vacunal microbiano es la prueba de la presencia de IgG específica de dicho antígeno vacunal microbiano y de la formación de un complejo (S-Agvac-IgG antiAgvac- Ac_1 anti IgG*) y no de un complejo falso positivo que resulta de la reacción de los anticuerpos antinucleares con el antígeno microbiano según el complejo (S-Agvac-Ac anti nucl.- Ac_1 anti IgG*).

15 Más preferentemente, se verifica la reactividad de dicha sustancia de detección introducida en dicha muestra de suero a ensayar, antes de verificar la ausencia de anticuerpos antinucleares en dicha muestra.

20 Si dicha sustancia de detección es reactiva, se debe detectar el complejo siguiente (S-IgG $_1$ - Ac_1 anti IgG*) con dicho primer antígeno (IgG $_1$). En este caso, la ausencia de reacción de dicha sustancia de detección con dicho segundo antígeno es la prueba de la ausencia de anticuerpos antinucleares.

25 Más particularmente, el depósito de IgG de la especie del paciente, en particular humanas, γ -específica (específica de la cadena gamma de las inmunoglobulinas de la especie del paciente, en particular humanas) como dicho primer antígeno permite controlar positivamente la introducción de la inmunoglobulina conjugada anti-IgG durante la reacción serológica así como su reactividad inmunológica (aspecto cualitativo). En efecto, este anticuerpo conjugado se fijará asimismo sobre el depósito de IgG que será por lo tanto reconocido obligatoriamente durante la fase de detección de las IgG específicas de la reacción serológica.

30 La presente invención permite por lo tanto la detección sistemática de anticuerpos antinucleares, en un suero utilizado para un diagnóstico serológico mediante inmunofluorescencia indirecta, después del depósito robotizado de inmunoglobulinas de la especie del paciente, en particular humanas, de clase G (IgG) y de células nucleadas de la especie del paciente, en particular humanas, sobre el soporte de la reacción serológica. Asimismo, el depósito robotizado de inmunoglobulinas de la especie del paciente, en particular humanas IgG, permite controlar la presencia de los anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas G de la especie del paciente, en particular humana, utilizados.

35 Un error frecuente en la realización de los ensayos serológicos, en particular para los ensayos serológicos en batería realizados en un gran número de sueros a ensayar, se debe a unos defectos en la introducción de los sueros a ensayar, en particular mediante pipeteo. Estos errores intervienen en particular en las etapas que implican el desplazamiento de la muestra a ensayar, en particular mediante pipeteo, pudiendo algunos recipientes, en particular que contienen el soporte sólido sobre el cual se deposita el antígeno a detectar, no estar llenos por inadvertencia con el suero de la especie del paciente, en particular humana, a ensayar. Se conoce que el pipeteo de suero tiene un margen de error de 1%, relacionado con un problema puramente técnico por ausencia de pipeteo por la pipeta, o con un error humano por ausencia de pipeteo por inadvertencia.

45 Estos errores imponen la introducción de controles en la realización de la reacción. La incorporación sistemática durante cada nueva manipulación de un suero de control negativo, es decir, que no contiene anticuerpos específicos del antígeno a ensayar permite interpretar las reacciones positivas. Asimismo, la incorporación de un suero de control positivo, es decir que contiene el anticuerpo específico del antígeno ensayado con un título conocido, permite verificar la calidad del antígeno y de la inmunoglobulina conjugada.

50 Sin embargo, no existe en la actualidad ningún control fiable de que el suero a ensayar ha sido realmente introducido en el ensayo serológico. Ahora bien, si por inadvertencia, el suero a ensayar no se introduce en el ensayo serológico, la reacción antígeno bacteriano-anticuerpo sérico seguramente no se producirá, y el ensayo se interpretará, falsamente, como negativo (falso-negativo). En la presente invención, se aprovecha que la proteína A del *Staphylococcus aureus* (estafilococo dorado) presenta una afinidad para los sueros de origen animal, en particular el caballo, los bovinos, el cerdo, el conejo, la cobaya, el ratón; en menor medida el hámster, la rata y el carnero. Sin embargo, el suero de polluelo y de cabra no reacciona con la proteína A. La proteína A es un polipéptido de 42 kDa, y es un constituyente de la pared de las cepas de *Staphylococcus aureus*, estando unas proteínas similares pero diferentes caracterizadas en la superficie de las bacterias del género *Streptococcus* [Langone J.J. Adv. Immunol. 1982, 32:157-251]. Esta propiedad de la proteína A de *Staphylococcus aureus* ya ha sido utilizada en un ensayo serológico en el ser humano para el diagnóstico serológico de las endocarditis infecciosas [Rolain JM, Lecam C, Raoult D. Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and Bartonella. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003; 10:1147-8].

65 La presente invención comprende por lo tanto la introducción de un control de introducción del suero a ensayar

durante las reacciones de serologías.

Con este fin, se controla que dicha muestra ensayada contiene realmente un suero de la especie del paciente, detectando si unas inmunoglobulinas de la especie del paciente reaccionan con un tercer antígeno de control que contiene la proteína A de una bacteria *Staphylococcus aureus*, preferentemente poniendo en contacto dicha muestra con un mismo soporte sobre el cual se fija dicho tercer antígeno de control, en presencia de una misma sustancia de detección que es una sustancia que reacciona con una inmunoglobulina de la especie del paciente y no con dicho tercer antígeno de control, preferentemente un anticuerpo antiinmunoglobulina de la especie del paciente y que no reacciona con la proteína A.

En la medida en la que la proteína A reacciona con unas inmunoglobulinas animales y humanas de manera no específica, incluso en el caso de patología infecciosa importante, es posible utilizar esta proteína A como control positivo de la introducción de un suero de la especie del paciente, en particular humana, en la muestra a ensayar.

En un modo de realización ventajoso, dicho tercer antígeno de control es una bacteria entera *Staphylococcus aureus* que comprende la proteína A. Se pueden utilizar más particularmente las bacterias *Staphylococcus aureus* depositadas en las colecciones públicas tales como las bacterias depositadas en la A.T.C.C. con el nº 29213 y en la C.N.C.M. del Institut Pasteur (Francia) con el número 65.8T tal como se ha descrito en la publicación mencionada anteriormente [Rolain JM, Lecam C, Raoult D. Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and Bartonella. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003; 10:1147-8].

Por otra parte, aparte de las cepas-tipos, cualquier cepa bacteriana identificada como *Staphylococcus aureus* puede ser utilizada como dicho tercer antígeno de control.

Preferentemente, dicha sustancia de detección es una inmunoglobulina animal, más preferentemente una inmunoglobulina de cabra o de pollo.

Ventajosamente, se realizan sucesivamente las etapas siguientes:

- control de la presencia de un suero en la muestra a ensayar en presencia de dicha sustancia de detección, y
- control de la presencia de anticuerpo antinuclear en la muestra a ensayar.

Más ventajosamente, se detecta y, llegado el caso, se cuantifica la dosis de dicha inmunoglobulina de la especie del paciente de clase G específica de dicho antígeno vacunal en la muestra a ensayar, mediante la lectura automatizada de la intensidad de la señal emitida por dicho elemento de marcado con la ayuda de un aparato de lectura apropiado para dicha señal por dicho elemento de marcado.

Como elemento de marcado de dichas sustancias de detección, se puede utilizar asimismo un elemento de marcado radioactivo, aunque los marcados fluorescentes siguen siendo preferidos, tal como se ha mencionado anteriormente.

La expresión "marcado radioactivo" significa que el anticuerpo contiene un isótopo radioactivo que permite dosificarlo mediante el recuento de la radioactividad que le está asociada, pudiendo el isótopo estar contenido o bien en un elemento de la estructura del anticuerpo, por ejemplo los residuos de tirosina constitutivos, o bien en un radical apropiado que le ha sido fijado.

Cuando se utiliza una sonda radioactiva, como por ejemplo el yodo 125, la radioactividad asociada a la muestra ensayada está completada en un contador gamma según cualquier modalidad apropiada y por ejemplo después de la solubilización de las células por una disolución alcalina (por ejemplo una disolución de sosa) y de la recuperación de la disolución que contiene la radioactividad con la ayuda de un tampón absorbente.

En un modo de realización, un protocolo de sucesión de lectura de los controles es el siguiente:

- 1) se verifica que dicho tercer antígeno de control que contiene la proteína A reacciona con dicha sustancia de detección. En su defecto, se interrumpe el ensayo, es decir no se tiene en cuenta esta muestra.
- 2) Si dicho primer antígeno de control (IgG₁) no reacciona con dicha sustancia de detección (Ac₁ anti IgG*), dicha sustancia de detección no está presente o no es reactiva. No se tiene en cuenta el resultado del ensayo que se refiere a la detección de las IgG específicas del antígeno microbiano.
- 3) Si dicho primer antígeno de control (IgG₁) reacciona con la sustancia de detección, se puede continuar con el ensayo, es decir tener en cuenta los resultados siempre que se realicen las verificaciones siguientes referentes a las reacciones con los antígenos de control.
- 4) Si dicho segundo antígeno de control que contiene un complejo ADN/histona reacciona con dicha sustancia de detección, unos anticuerpos antinucleares están presentes y no se tienen en cuenta los ensayos de detección y de cuantificación de las IgG específicas.

5) Si dicho segundo antígeno no reacciona, y dicha sustancia de detección está presente y es reactiva, no hay ningún anticuerpo antinuclear, y se puede seguir siempre que se realice la verificación siguiente.

5 En resumen, se tiene en cuenta el resultado de la reacción con dicho antígeno vacunal microbiano sólo si se reúnen las condiciones acumulativas siguientes:

- dicho primer antígeno de control (IgG) reacciona con dicha sustancia de detección, y
- dicho segundo antígeno de control (ADN) no reacciona, y
- 10 - dicho tercer antígeno de control (proteína A) reacciona con dicha sustancia de detección.

En un modo de realización preferido, para cada detección y, llegado el caso, cada cuantificación de dicho antígeno vacunal, se realizan las mediciones siguientes:

15 1- una primera medición de un primer valor representativo de la cantidad de un primer elemento de marcado preferentemente el primer valor de la intensidad de una señal emitida por dicho primer elemento de marcado fluorescente, fijándose dicho primer elemento de marcado de manera no específica sobre cualquier proteína en la zona de depósito de dicho antígeno vacunal, y

20 2- una segunda medición de un segundo valor representativo de la cantidad de un segundo elemento de marcado diferente de dicho primer elemento de marcado y que emite una señal diferente, preferentemente un segundo valor de la intensidad de la señal emitida por este segundo elemento de marcado fluorescente a una longitud de onda de excitación diferente de la de dicho primer elemento de marcado fluorescente, siendo dicho segundo elemento de marcado el elemento de marcado de dicha sustancia de detección de dicho antígeno vacunal, en la zona de depósito de dicho antígeno, y

25

3- se calcula la relación de dicho primer y segundo valores, y

30 4- Se compara el valor de dicha relación con el de una relación de referencia obtenida con una colección de sueros de referencia positivos y negativos, permitiendo así mediante comparación determinar la necesidad o no de vacunar a la persona para dicho antígeno según el valor de la relación de dicho primer y segundo valores.

Un equipo de diagnóstico útil para la realización de un método según la invención comprende:

- 35 - un mismo soporte sólido sobre el cual se fija por lo menos una pluralidad de antígenos vacunales y, llegado el caso, por lo menos un antígeno de control, y
- unos agentes reactivos tales como una sustancia de detección y si fuese necesario unos agentes reactivos útiles para la detección de dicho elemento de marcado.

40 Preferentemente, el equipo comprende:

- un mismo soporte sólido sobre el cual se fijan por lo menos un antígeno vacunal corpuscular y dicho primero, segundo y tercer antígenos de control, y
- 45 - una misma sustancia de detección.

50 Ventajosamente, en los métodos de diagnóstico según la invención, se utiliza como soporte sólido una lámina de vidrio o de plástico, o un pocillo de una placa de microtitulación de fondo plano, de vidrio o de plástico.

Para la realización de la determinación del estatus vacunal según la presente invención, es posible extraer el suero mediante una punción venosa con aguja o bien mediante extracción de sangre capilar, en particular a partir del lóbulo de la oreja, de la yema del dedo, del talón, acoplado con una recogida sobre un disco de papel filtro o preferentemente de forma directa en un tampón que permite la elución del suero.

55 Según otra característica ventajosa de la presente invención, se realiza, después de una extracción de sangre capilar en un tubo capilar que permite recoger un volumen conocido de sangre total, la recogida de dicha muestra en un frasco que contiene un volumen conocido de un tampón de elución. Esta modalidad de recogida original presenta como ventaja su rapidez (realizándose las recogidas, la elución y dilución en un minuto). El hecho de que el suero se diluye a una concentración conocida, en particular de 1/20 a 1/100, es una seguridad de manipulación frente al riesgo de accidentes de exposición a la sangre tales como la transmisión de virus y otros patógenos sanguíneos para el extractor.

60 Por otra parte, la presente invención permite la determinación del estatus vacunal de la persona contra varios antígenos vacunales simultáneamente, sobre una sola muestra de suero extraída por punción capilar, en un lapso de tiempo inferior a 2 horas.

Ventajosamente, se recoge un volumen determinado de sangre total con la ayuda de un tubo capilar en un frasco que contiene un volumen determinado de un tampón que permite la elución del suero, siendo entonces preferentemente el suero diluido a una concentración determinada, preferentemente de 1/100 a 1/20, y se deposita un volumen determinado de suero así diluido en las diferentes zonas de depósito de dichos antígenos de control y antígenos vacunales sobre dicho soporte sólido.

Sea cual sea el modo de recogida de la sangre, "extracción de sangre" o "punción capilar", conviene en un primer tiempo separar el suero de los glóbulos sanguíneos. En el caso de la punción capilar, esta separación se realiza mediante una elución por un tampón de elución, y es el producto de esta elución el que se pone en contacto con la lámina.

Y por lo tanto, ventajosamente, el equipo comprende un frasco que comprende un volumen determinado de un tampón de elución para recoger un volumen determinado de una muestra de suero a ensayar.

Son conocidos los métodos y kits de diagnóstico que implican la utilización de un soporte sólido en el que se fijan de manera covalente unas proteínas solubles, pero estos acoplamiento químicos covalentes son complejos y costosos de realizar. Se ha propuesto la fijación no covalente de proteína soluble o antígeno particular sobre soporte sólido mediante adsorción física o fisicoquímica sobre el soporte, en el ámbito de los protocolos de ensayos de inmunodetección sobre soporte sólido, pero la estabilidad de la fijación es insuficiente. Una dificultad tiende a que es necesario lavar bien previamente el soporte sólido para eliminar los residuos de elementos de marcado que pueden interferir con la lectura de los resultados mientras que estos lavados hacen demasiado inestable la adsorción física de las sustancias sobre el soporte sólido. Otra dificultad tiende a que no es posible depositar, con unos robots de depósito, unos antígenos corpusculares tal cual, ya se trate de células o bacterias enteras o parciales, tal como se ha mencionado anteriormente.

Otro objetivo de la presente invención es por lo tanto proporcionar un ensayo fiable de inmunodetección de antígenos vacunales microbianos, en particular de antígenos vacunales particulados, mediante un método y unas herramientas simples de utilizar y de realizar para una aplicación en rutina de laboratorio en el ámbito de la realización de ensayos en serie en particular.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de preparación de soporte sólido que permite un depósito robotizado sobre el soporte, de antígenos de control o vacunales particulados o corpusculares, así como la lectura automatizada de los resultados de la reacción inmunológica de dichos antígenos fijados sobre el soporte sólido en un ensayo de suero de paciente que implica una reacción de serología microbiana de las IgG específicas por adsorción con el antígeno vacunal o antígeno de control particulado o corpuscular depositado sobre el soporte sólido.

Un método de preparación de un soporte sólido útil en un método o un equipo según la invención, se caracteriza porque se deposita y se fija mediante adsorción física sobre dicho soporte sólido una pluralidad de dichos antígenos vacunales que comprenden por lo menos un antígeno vacunal corpuscular en forma de suspensión de microbios enteros o fracción de microbios, en particular virus o bacterias, preferentemente, y llegado el caso, un antígeno vacunal en forma de virus entero vivo desactivado y, llegado el caso, unos antígenos de control en forma de suspensión de corpúsculos de células no confluentes o bacterias enteras o fracción de células o bacterias, siendo dichos antígenos corpusculares preferentemente depositados por un robot de depósito en particular de tipo jeringa.

Preferentemente, dichos antígenos corpusculares vacunales y/o de control están asociados a un colorante, preferentemente un colorante fluorescente, en forma de suspensión a una concentración que permite su visualización después del depósito con la ayuda de dicho colorante, que permite verificar la fijación de dichos antígenos sobre el soporte sólido.

Los inventores han puesto a punto, después de numerosos ensayos infructuosos, unas condiciones de depósito robotizado de antígenos vacunales microbianos corpusculares (microbio entero inactivado o fracción de microbio entero inactivado) en suspensión en un medio de depósito. En efecto, actualmente, se deposita sobre un soporte sólido, mediante los robots de depósito, únicamente unas disoluciones homogéneas de una o varias moléculas. Para ello, la concentración de estos antígenos corpusculares se calibra antes del depósito mediante el recuento de las partículas microbianas inactivadas mediante "fluorescence activated cell sorting (FACS-scann) y se depositan de manera robotizada sobre un soporte sólido. La elaboración de estos depósitos calibrados y robotizados comprende la determinación mediante unos ensayos de la concentración óptima para cada uno de los antígenos ensayados, las concentraciones infra-óptimas que dan unos depósitos indetectables, las concentraciones supra-óptimas que provocan una sedimentación de los antígenos corpusculares de fuerte densidad y de dimensiones micrométricas tales como las bacterias enteras o fraccionadas durante el depósito y por lo tanto una variación sustancial de la cantidad de antígeno depositado. Por último, los depósitos de antígenos corpusculares que comprenden ADN microbiano (bacteria, virus, parásitos u hongos microscópicos) son calibrados mediante la aplicación de un colorante, preferentemente fluorescente, en particular una molécula tal como la AMCA que se fija de manera no específica a las proteínas contenidas en el antígeno o una molécula de intercalación que se fija de manera no

específica al ADN mediante intercalación en la doble hélice. Este último método se utiliza preferentemente para marcar las células utilizadas como control en las láminas. Las longitudes de onda de excitación y de emisión se seleccionan ventajosamente en función de las utilizadas por el fluorocromo que marca las inmunoglobulinas de detección. Este marcado fluorescente no específico de los antígenos se puede realizar antes de su depósito por el robot de depósito o después de éste. El marcador fluorescente se selecciona ventajosamente por su estabilidad a la luz del día.

Más particularmente, en el método de preparación de soporte sólido, los antígenos de control en forma de suspensión de células son calibrados a una concentración de 10^7 a 10^9 células/ml, las suspensiones de bacterias o fracciones de bacterias a una concentración de 10^7 a 10^9 partículas/ml y las suspensiones de virus enteros a una concentración de 10^9 a 10^{10} partículas/ml.

Ventajosamente, se depositan dichos antígenos de control y vacunales corpusculares en mezcla con un ligante proteico, lo cual estabiliza la fijación sobre dicho soporte sólido.

Más particularmente, dicho ligante proteico se selecciona de entre la mezcla orgánica compleja formada por la yema de huevo, gelatina, albúmina de suero bovino o una IgG policlonal no humana, preferentemente de cabra.

Estos ligantes proteicos funcionan como un pegamento biológico de dicho antígeno sobre el soporte sólido.

Los diferentes ligantes han sido ensayados sobre lámina de vidrio y se han determinado las concentraciones óptimas de utilización. Se puede utilizar en particular la albúmina sérica bovina a una concentración final (volumen por volumen) de 1 a 5%, una suspensión de yema de huevo a una concentración final de 1 a 10% y dicha IgG caprina a una concentración final de 25 a 75%.

Los inventores han observado durante diferentes ensayos realizados que ciertos antígenos unidos por huevo o albúmina bovina se lavaban durante las etapas de lavado pero que las inmunoglobulinas humanas IgG introducidas como control seguían invariablemente fijadas sobre la lámina de vidrio. Los inventores han deducido que las inmunoglobulinas de clase G se fijaban a la lámina de vidrio de tal manera que éstas soportaban las etapas de lavado y han formado la hipótesis de que estas IgG permitirían por lo tanto fijar asimismo bajo unas condiciones apropiadas ciertos antígenos vacunales. Por lo tanto, los inventores han utilizado unas IgG de otra especie que el ser humano, con el fin de no interferir en los ensayos serológicos, y los autores han determinado así las propiedades notables de las IgG de cabra a título de pegamento biológico que permite fijar los antígenos particulados, en particular los antígenos vacunales particulados o corpusculares.

Preferentemente y más particularmente, dicho antígeno vacunal corpuscular se deposita sobre dicho soporte sólido constituido por una lámina de vidrio, en mezcla con una inmunoglobulina de tipo IgG policlonal de cabra.

En un método de preparación de un soporte sólido en el que se fija una pluralidad de dichos antígenos vacunales, y llegado el caso, dicho primer, segundo y tercer antígenos de control, que permite una detección mediante lectura automatizada con la ayuda de una sustancia de detección, útil en un método según la invención, se realiza un lavado previo de dicho soporte sólido con una disolución de una mezcla etanol/acetona, preferentemente a 50/50, y después se deposita y se estabiliza la fijación de dichos antígenos por adsorción física sobre dicho soporte sólido mediante un tratamiento con alcohol, preferentemente metanol o etanol, alcohol que se elimina después y, preferentemente, se verifica la fijación de dichos antígenos mediante coloración, en particular mediante un marcado fluorescente no específico de las proteínas o del ADN tal como se ha explicado anteriormente.

Esta disolución de prelavado permite limpiar el soporte de cualquier traza de sustancia de detección u otra residual y, en particular, eliminar cualquier fluorescencia, conservando al mismo tiempo la facultad de adsorción del soporte frente a dichos antígenos depositados después.

El tratamiento de estabilización con alcohol permite estabilizar la fijación por adsorción tanto de las proteínas, tales como IgG, como de los antígenos particulados.

La determinación del lavado previo apropiado del soporte sólido, en particular de la lámina de vidrio ha dado lugar a numerosos ensayos. Este tratamiento tiene por objetivo limpiar perfectamente este soporte para eliminar los artefactos fluorescentes preservando al mismo tiempo la fijación ulterior de los antígenos de manera compatible con su modo de conservación pero, asimismo, preservando, si no la integridad, por lo menos la reactividad inmunológica de los antígenos. Se ha demostrado, después de numerosas investigaciones infructuosas, que el aclarado y la limpieza de las láminas en fase acuosa no permitirían una fijación ulterior de los antígenos a depositar; ocurría lo mismo para el aclarado a base de moléculas tensioactivas tal como el Tween 20. La limpieza con alcoholes no era suficiente para retirar la mayoría de los artefactos fluorescentes. Es por lo tanto al final de estos múltiples ensayos cuando se ha optimizado un protocolo de limpieza de soporte sólido, en particular de la lámina de vidrio, mediante una mezcla etanol 50% - acetona 50% y después secado al aire.

Sin embargo, incluso en este caso, sigue siendo ventajoso completar la fijación mediante adsorción física por un

tratamiento de reticulación, en particular mediante tratamiento químico con un agente bi-funcional de acoplamiento covalente tal como el glutaraldehído o unos derivados de ácidos activados, en particular ácido succínico, conocidos por el experto en la materia para asegurar unos puentes covalentes entre dichos antígenos de control y microbianos con el soporte sólido.

5 Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: Depósito de dicho segundo y tercer antígenos de control sobre soporte sólido.

10 Las células HL60 (nº ATCC CCL 240) son unas células fibroblásticas humanas en línea continua utilizadas para la detección de los anticuerpos antinucleares. Después del cultivo y de la producción según los protocolos habituales, se ha cuantificado la concentración de células HL 60 con la ayuda de un contador de células (Microcytes® BPC/Yeast, BioDETECT AS, Oslo, Noruega) y esta suspensión ha sido reaportada a 10⁸ células/ml en un tampón BPS estéril, pH = 7,4, para obtener una suspensión de células no confluentes que pueden ser depositadas por un robot de depósito.

20 Se ha cultivado *Staphylococcus aureus* (nº de depósito ATCC 29213) sobre gelosa al 5% de sangre de carnero, y después se ha recogido en un tampón PBS estéril que contiene 0,1% de azida de sodio. El inóculo ha sido medido con la ayuda del mismo contador de células y calibrado a 10⁹ bacterias/ml que es la concentración óptima teniendo en cuenta las tensiones de ausencia de sedimentación durante el depósito y un depósito en cantidad suficiente de partículas estafilocócicas y después conservado por congelación a -80°C.

25 Se han depositado estas células HL60 y unas bacterias de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 10⁹ CFU/ml determinada por FACS-scan (Microcytes®) de las láminas de vidrio (referencia LLR2-45, CML, Nemours, Francia). Las células y las bacterias han sido depositadas sobre el soporte sólido con la ayuda de un robot de depósito o "spotter" (Arrayer 427™, Affymetrix, MWG Biotech SA, Courtaboeuf, Francia). Los depósitos han sido secados al aire durante 30 minutos en el recinto del "spotter", y después fijados en un baño de metanol al 100% durante 10 minutos, y después secados nuevamente al aire libre. La eficacia del depósito robotizado sobre las láminas, después de la fijación con etanol y después de los baños necesitados por la reacción de inmunofluorescencia indirecta siguiente, ha sido verificada con éxito por la coloración por el colorante fluorescente Hoescht 333-42 (molécula de intercalación que se intercala en el ADN) que se excita a 350 nanómetros y que emite a 460 nanómetros (Molecular Probes).

35 **Ejemplo 2: Depósito de dicho primer antígeno de control (IgG) sobre soporte sólido**

Unas inmunoglobulinas humanas de clase G γ -específicas (IgG) (Serotec, Cergy Saint-Christophe, Francia) diluidas a una concentración de 5 mg/ml para obtener unos "spots" bien homogéneos, han sido depositadas de manera robotizada con la ayuda de un robot de depósito (modelo 427, Arrayer, Affymetrix, Inc., CA) sobre un soporte sólido constituido por una lámina de vidrio (Referencia LLR2-45, CML, Nemours, Francia).

45 Los depósitos han sido realizados mediante transferencia de la suspensión de antígeno de un pocillo de placa de microtitulación que contiene 25 μ l de suspensión, con un volumen de 1 ml depositado, a 25°C y 55% de humedad en el recinto del robot de depósito. Estas condiciones han sido controladas por un termo-higrómetro. Los depósitos de una dimensión de 200 μ m han sido secados al aire durante 30 minutos a 37°C en el recinto del robot de depósito, y después fijados en un baño de etanol al 100% durante 10 minutos, y después secados nuevamente al aire libre. La eficacia del depósito robotizado y de la fijación con etanol después de los baños necesitados por la reacción de inmunofluorescencia indirecta ha sido verificada mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

50 Se han depositado 10 sueros humanos cada uno en un depósito de IgG con tres diluciones cada uno, 1:32, 1:64 y 1:128. Después de un primer lavado, una reacción de inmunofluorescencia indirecta ha sido realizada utilizando una inmunoglobulina de cabra (referencia A-21216, Molecular Probes, Eugene, USA) a título de anticuerpo secundario anti-IgG humanas, acoplado con Alexa 488 que es una molécula fluorescente excitada a 488 nanómetros y que emite a 540 nanómetros, y utilizando la misma inmunoglobulina anti-IgG acoplada al Alexa 594 (A-21216, Molecular Probes, Eugene, USA) que es una molécula fluorescente excitada a 594 nanómetros y que emite a 640 nanómetros en un segundo experimento. La lectura de la reacción ha sido llevada a cabo con microscopio de fluorescencia y ha mostrado una detección fluorescente en todos los sueros en forma de un "spot" muy brillante para cada una de las 3 diluciones ensayadas. Este ejemplo ilustra que es posible realizar un depósito robotizado de IgG humanas sobre un soporte sólido en unas condiciones compatibles con la realización de una reacción de inmunofluorescencia indirecta.

60 **Ejemplo 3: Determinación del estatus vacunal de personas.**

65 Se ha puesto a punto una lámina de vidrio para la determinación del estatus vacunal de las personas que comprende un total de 8 depósitos de antígenos que comprenden 3 depósitos de controles y 5 depósitos de antígenos vacunales en una misma lámina, repartidos en 2 columnas. Las modalidades de depósito y de utilización de los 3 depósitos controles que comprenden *Staphylococcus aureus*, IgG y células HL-60 se han expuesto en los

ejemplos 1 y 2 anteriores.

Los depósitos vacunales han sido llevados a cabo en forma de suspensión vírica de virus enteros vivos inactivados depositados a una concentración de 10^9 ó 10^{10} partículas/ml en mezcla con una IgG caprina a una concentración de 25 a 75% (volumen por volumen) y según las modalidades siguientes:

(1) antígeno rubéola: se trata de la cepa hpv-77 (microbix Biosystems, Inc., Toronto, Ontario, Canadá) suministrada en forma de una suspensión vírica inactivada a concentración proteica de 0,51 mg/ml. Este antígeno ha sido concentrado 10 veces mediante centrifugación antes de su depósito bajo un volumen de 45 μ l de antígeno y 5 μ l de inmunoglobulina IgG de cabra que titula a 10 mg/ml (referencia I5256, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia), coloreadas por 2 μ l de aminomethyl coumarine acetyl (AMCA) (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, Francia).

El AMCA se fija de manera no específica a las proteínas de este antígeno y permite por lo tanto verificar el depósito del antígeno sobre el soporte sólido mediante adsorción física. Se excita a una misma longitud de onda de 350 nm que el colorante HOESCHT 333-42.

(2) antígeno rubéola: se trata de la cepa Edmonston (Microbix Biosystems, Inc.) suministrada en forma de una suspensión de partículas víricas inactivadas a una concentración proteica de 1,95 mg/ml que ha sido concentrada 5 veces mediante centrifugación antes de su depósito bajo un volumen de 45 μ l de antígeno y 5 μ l de inmunoglobulina IgG de cabra coloreada con AMCA.

(3) Antígeno de las paperas: se trata de la cepa Enders (compañía microbix-biosystem incorporated) que titula a una concentración proteica de 1,8 μ g/ml y depositada en un volumen de 45 μ l de antígeno y 5 μ l de inmunoglobulina IgG de cabra marcados con AMCA.

(4) anatoxina diftérica (referencia FA 150934, Aventis Pasteur Vaccins) que titula a una concentración proteica de 18,9 mg/ml y concentrada 10 veces antes de su depósito bajo un volumen de 45 μ l de antígeno y 5 μ l de inmunoglobulinas IgG de cabra marcadas con AMCA.

(5) anatoxina tetánica (referencia J001, Aventis Pasteur vaccins) que titula a una concentración de 80 UI/ml y depositada pura bajo un volumen de 45 μ l de antígeno y 5 μ l de inmunoglobulina IgG de cabra marcadas con AMCA.

Los depósitos de antígenos han sido llevados a cabo bajo un volumen de 1 nl por un "spotter" de marca Affymetrix®, de modelo Arrayer 427. Después del secado, las láminas así preparadas han servido de soporte para una reacción de inmunofluorescencia indirecta para la detección de las IgG específicas de los antígenos vacunales en el suero de las personas según el protocolo siguiente:

1- en una primera etapa, 5 μ l de suero extraído por punción venosa o por punción capilar, se ponen en contacto y se incuban con la lámina a nivel de los diferentes antígenos vacunales y antígenos de control, mediante un autómata de incubación.

2- en una segunda etapa, el autómata aclara la lámina con el fin de eliminar el suero ensayado y realiza una incubación con el anticuerpo de detección anti-IgG humanas conjugado con la fluoresceína que se excita a una longitud de onda de 488 nm (referencia Star 106F, Serotec, Francia),

3- en una tercera etapa, el autómata aclara la lámina con el fin de eliminar el anticuerpo de detección conjugado, y seca la lámina,

4- en una cuarta etapa, la lámina así tratada se retira del autómata de incubación y se dispone en la cámara de lectura de un lector automático de fluorescencia. Este lector realiza sucesivamente dos lecturas, una a 350 nm que es la longitud de onda de emisión del colorante AMCA y después una segunda lectura a 488 nm que es la longitud de onda de emisión de la fluoresceína del anticuerpo de detección,

5- en una quinta etapa, estos datos son transmitidos a un programa con el fin de ser convertidos en intensidad de fluorescencia a 350 nm y a 488 nm para cada uno de los depósitos,

6- en una sexta etapa, el programa analiza los niveles de fluorescencia de los controles y verifica sucesivamente

* la presencia de fluorescencia para el depósito de *Staphylococcus aureus* para verificar la presencia del suero a ensayar;

* la presencia de fluorescencia del depósito de IgG para verificar la calidad de la reacción que implica el anticuerpo de detección conjugado;

* la ausencia de fluorescencia del depósito de células HL60 para verificar la presencia o ausencia de anticuerpos antinucleares en el suero a ensayar.

5 7- en una séptima etapa, el programa calcula la proporción de fluorescencia 488/350 para cada uno de los depósitos de antígenos vacunales y compara para cada depósito de antígeno vacunal este valor con una curva de proporción previamente establecida para cada antígeno vacunal con la ayuda de sueros controles positivos que poseen unos anticuerpos específicos a una concentración conocida mediante un método de referencia y de sueros negativos que no poseen ningún anticuerpo específico detectable mediante un método de referencia,

10 La fluorescencia a 350 nm resulta de la excitación de marcadores no específicos que se fijan de manera no específica al ADN o a las proteínas de los antígenos vacunales. La cantidad de fluorescencia emitida por los depósitos de antígenos a 350 nm es proporcional a la cantidad de antígenos efectivamente presentes en el depósito, de manera que esta fluorescencia a 350 nm es una medición que depende de la cantidad de antígenos presente en el depósito. La cantidad de fluorescencia a 350 nm se utiliza por el programa

* por un lado para indicar la posición topográfica de los depósitos de antígenos sobre la lámina, y

20 * por otro lado para cuantificar su superficie exacta y por lo tanto sus contornos con el fin de no incorporar unos artefactos de fluorescencia que estarían situados fuera de estos spots, y

25 * finalmente para ponderar la fluorescencia a 488 nm. Esta segunda longitud de onda de 488 nm resulta de la excitación del marcador de la inmunoglobulina G de detección. La cantidad de fluorescencia a 488 nm está relacionada con la cantidad de inmunoglobulina G específica presente en el spot del suero del paciente a ensayar. La fluorescencia a 488 nm (y por lo tanto la fijación de las inmunoglobulinas G) depende de la cantidad de antígenos que han sido depositados. En efecto, si se deposita muy poco antígeno, la cantidad de inmunoglobulina específica fijada será baja y por lo tanto el nivel de fluorescencia a 488 nm será bajo. Es por eso que la cantidad de fluorescencia a 488 nm está ponderada para cada uno de los spots de antígenos vacunales por la cantidad de fluorescencia a 350 nm y la proporción de la fluorescencia que expresa la cantidad de IgG específicos presentes en el suero ensayado.

30 8- en una última etapa, el programa interpreta mediante comparación unas proporciones de fluorescencia 488/350 medidas con los sueros ensayados con las obtenidas con una colección de sueros de referencia positivos y negativos para cada uno que han permitido establecer las curvas de referencia, el conjunto de estos datos para indicar la lista de los antígenos vacunales contra los cuales el suero ensayado posee unos anticuerpos específicos, y por lo tanto el estatus vacunal de la persona.

35 Así, en este ejemplo, se han ensayado cuatro sueros extraídos de cuatro pacientes diferentes para buscar la presencia de anticuerpos de clase IgG contra los antígenos vacunales del sarampión, de la rubéola, de las paperas, de la difteria y del tétanos. El valor umbral de la proporción de fluorescencia ha sido determinado para cada uno de estos 5 antígenos vacunales.

40 Las tablas 1A, 1B, 1C y 1D muestran las proporciones de fluorescencia para cada uno de los 4 sueros ensayados, respectivamente.

45 La lectura de las tablas 1A a 1C indica que:

- el suero nº 1 es:

50 * positivo para la presencia de anticuerpos antianatoxina diftérica (proporción de fluorescencia > 1, valor umbral),

* positivo para la presencia de anticuerpos antianatoxina tetánica (proporción de fluorescencia > 0,05, valor umbral),

55 * negativo para la presencia de anticuerpos antirubéola (proporción de fluorescencia > 0,1, valor umbral),

* positivo para la presencia de anticuerpos antisarampión (proporción de fluorescencia > 0,1, valor umbral),

60 * positivo para la presencia de anticuerpos antipaperas (proporción de fluorescencia > 0,11, valor umbral),

- el suero nº 2 es:

65 * positivo para la presencia de anticuerpos antianatoxina diftérica (proporción de fluorescencia > 1, valor umbral),

ES 2 368 933 T3

- 5
- * positivo para la presencia de anticuerpos antianatoxina tetánica (proporción de fluorescencia > 0,05, valor umbral),
 - * positivo para la presencia de anticuerpos antirubéola (proporción de fluorescencia > 0,1, valor umbral),
 - * positivo para la presencia de anticuerpos antisarampión (proporción de fluorescencia > 0,1, valor umbral), y
 - * positivo para la presencia de anticuerpos antipaperas (proporción de fluorescencia > 0,11, valor umbral),
- 10 - el suero nº 3 es:
- * negativo para la presencia de anticuerpos antianatoxina diftérica (proporción de fluorescencia < 1, valor umbral),
- 15
- * negativo para la presencia de anticuerpos antianatoxina tetánica (proporción de fluorescencia < 0,05, valor umbral),
 - * negativo para la presencia de anticuerpos antirubéola (proporción de fluorescencia < 0,1, valor umbral),
 - * positivo para la presencia de anticuerpos antisarampión (proporción de fluorescencia > 0,1, valor umbral), y
 - * negativo para la presencia de anticuerpos antipaperas (proporción de fluorescencia > 0,11, valor umbral),
- 20
- el suero nº 4 es:
- 25
- * negativo para la presencia de anticuerpos antianatoxina diftérica (proporción de fluorescencia < 1, valor umbral),
- 30
- * negativo para la presencia de anticuerpos antianatoxina tetánica (proporción de fluorescencia < 0,05, valor umbral),
 - * positivo para la presencia de anticuerpos antirubéola (proporción de fluorescencia > 0,1, valor umbral),
 - * negativo para la presencia de anticuerpos antisarampión (proporción de fluorescencia < 0,1, valor umbral), y
 - * negativo para la presencia de anticuerpos antipaperas (proporción de fluorescencia igual a 0,11, valor umbral),
- 35
- La figura 1 es un esquema que indica el plano de los depósitos de antígenos sobre la lámina vacunal.
- 40
- La figura 2 es la imagen de esta lámina después de la incubación con los 4 sueros citados anteriormente, obtenida a 350 nm (coloración fluorescente no específica después del marcado fluorescente no específico de las proteínas con AMCA y ADN con el colorante Hoescht 332-42). Esta imagen permite controlar la presencia de cada uno de los depósitos de antígeno de control y vacunales.
- 45
- En las figuras 1 y 2 aparece un spot (zona de depósito) IgM que no es útil en los ensayos realizados.

Tabla 1A

Suero nº 1						
Número	Abscisas	Ordenadas	Superficie	Fluorescencia 350	Proporción F350/F488	Fluorescencia 488
SA	240	127	1228	44238	1,274	56359
IgG	238	195	1198	54695	0,902	49335
Difteria	238	263	1203	44069	1,691	74521
Rubéola	235	332	1117	56298	0,075	4222
HL	309	123	452	9652	0,458	4421
IgM	306	197	918	18369	0,183	3362
Tétanos	304	266	842	26512	0,078	2068
Sarampión	303	334	1104	37075	0,13	4820
Paperas	302	401	1038	29978	0,118	3537

50

ES 2 368 933 T3

Tabla 1B

Suero n° 2						
Número	Abcisas	Ordenadas	Superficie	Fluorescencia 350	Proporción F488/ F350	Fluorescencia 488
SA	249	109	1199	41653	1,839	76600
IgG	250	177	1255	49420	1,263	62417
Difteria	251	247	1176	39874	2,350	93704
Rubéola	251	313	1173	50395	0,108	5443
HL	316	106	537	10853	0,627	6805
IgM	318	176	895	15917	0,249	3963
Tétanos	321	244	834	21013	0,357	7502
Sarampión	319	314	1164	39486	0,118	4659
Paperas	320	382	1079	31342	0,120	3761

Tabla 1C

Suero n° 3						
Número	Abcisas	Ordenadas	Superficie	Fluorescencia 350	Proporción F488/F350	Fluorescencia 488
SA	210	85	1175	34462	1,981	68269
IgG	210	153	1293	47678	1,561	74425
Difteria	210	220	1255	54523	0,342	18647
Rubéola	209	288	1172	49101	0,073	3584
HL	278	78	474	9180	0,740	6793
IgM	278	151	943	15225	0,335	5100
Tétanos	278	220	848	24553	0,046	1129
Sarampión	278	288	1178	34879	0,153	5336
Paperas	278	357	1123	26949	0,095	2560

Tabla 1D

Suero N° 4						
Número	Abcisas	Ordenadas	Superficie	Fluorescencia 350	Proporción F488/F350	Fluorescencia 488
SA	240	110	1202	40889	1,093	44692
IgG	240	177	1269	53557	1,123	60145
Difteria	242	246	1253	56284	0,316	17786
Rubéola	241	314	1106	43970	0,107	4705
HL	308	106	533	9932	0,797	7916
IgM	308	178	926	17540	0,309	5420
Tétanos	309	244	838	29892	0,049	1465
Sarampión	309	314	1174	41689	0,093	3877
Paperas	310	382	1044	29666	0,110	3263

5

REIVINDICACIONES

1. Método de determinación serológica del estatus vacunal de un individuo mediante la detección y cuantificación de los anticuerpos séricos de tipo IgG específicos de antígenos vacunales de una pluralidad de agentes patógenos de tipo bacterias, virus, hongos o parásitos, caracterizado porque se lleva a cabo la detección y la cuantificación de un complejo de reacciones inmunológicas entre cada dicho antígeno vacunal y respectivamente cada dicho anticuerpo específico de tipo IgG de dicho antígeno vacunal, eventualmente presentes en una muestra de suero humano a ensayar, realizando las etapas siguientes:
- 1- poner en contacto una única y misma muestra de suero a ensayar con:
- un mismo soporte sólido en el que se fija una pluralidad de dichos antígenos vacunales que corresponden a una pluralidad de agentes patógenos diferentes, preferentemente por lo menos 3, más preferentemente por lo menos 4 antígenos vacunales de agentes patógenos diferentes, en unas zonas diferentes del soporte,
 - en presencia de por lo menos una sustancia de detección que reacciona mediante complejación con dichos anticuerpos específicos de tipo IgG y que no reaccionan con dichos antígenos vacunales, y
- 2- determinar la concentración en dichos anticuerpos específicos de tipo IgG mediante la cuantificación de los complejos que resultan de la reacción de por lo menos una sustancia de detección con dichos anticuerpos específicos de tipo IgG complejados con dichos antígenos vacunales fijados sobre dicho soporte sólido.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha sustancia de detección comprende un marcado fluorescente.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque se determina la concentración de dichas inmunoglobulinas de la especie del paciente de clase G específica de dicho antígeno vacunal en la muestra a ensayar, mediante la lectura automatizada de la intensidad de la señal fluorescente emitida por dicho elemento de marcado fluorescente con la ayuda de un aparato de lectura apropiado capaz de cuantificarla.
4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dichos antígenos vacunales comprenden por lo menos 3, preferentemente de 3 a 12 antígenos vacunales de agentes patógenos diferentes seleccionados de entre los virus de las paperas, de la rubéola, del sarampión, de la varicela, de la poliomielitis, de la fiebre amarilla, de la encefalitis por garrapata, de la hepatitis A, de la hepatitis B y las bacterias de la tos ferina *Bordetella pertussis*, del tétanos y de la difteria.
5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se determina si la concentración de dichos anticuerpos específicos de tipo IgG alcanza un umbral determinado a partir del cual dicho anticuerpo específico tiene una acción protectora que protege contra la enfermedad determinada por el patógeno.
6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se utiliza una única sustancia de detección para la detección de los diferentes anticuerpos específicos de los diferentes antígenos vacunales.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque se utiliza una sustancia de detección que es una inmunoglobulina anti-IgG, preferentemente una inmunoglobulina de cabra o de polluelo.
8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se controla la presencia y la reactividad de dicha primera sustancia de detección realizando las etapas siguientes:
- poner en contacto dicha muestra a ensayar con un mismo soporte sólido, en el que se ha fijado además un primer antígeno de control que es una inmunoglobulina no específica de clase G, en presencia de una disolución que contiene una primera sustancia de detección, y
 - verificar si dicha sustancia de detección ha reaccionado con dicho primer antígeno de control fijado sobre dicho soporte sólido.
9. Método según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se controla la eventual presencia de un anticuerpo antinuclear en dicha muestra a ensayar,
- poniendo en contacto dicha muestra a ensayar con
 - * un mismo soporte sólido en el que se ha fijado un segundo antígeno de control que comprende unos complejos ADN/histonas, preferentemente que comprende unos núcleos de células nucleadas de células de la especie del paciente, más preferentemente la totalidad o parte de células de origen de la especie del paciente en línea continua, y

* en presencia de una sustancia de detección constituida por un anticuerpo de marcado que reacciona sólo con una inmunoglobulina de la especie del paciente de clase G; y

5 - verificando si dicho segundo antígeno de control fijado en el soporte sólido reacciona con dicha sustancia de detección.

10 10. Método según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se controla que dicha muestra ensayada contenga un suero de la especie del paciente, detectando si unas inmunoglobulinas de la especie del paciente reaccionan con un tercer antígeno de control que contiene la proteína A de una bacteria *Staphylococcus aureus*, preferentemente poniendo en contacto dicha muestra con un mismo soporte sólido en el que se fija un tercer antígeno de control, en presencia de una misma sustancia de detección que es una sustancia que reacciona con una inmunoglobulina de la especie del paciente y no con dicho tercer antígeno de control, preferentemente un anticuerpo antiinmunoglobulina de la especie del paciente y que no reacciona con la proteína A.

15 11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho tercer antígeno de control es una bacteria *Staphylococcus* entera que comprende la proteína A.

20 12. Método según una de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado porque dicha sustancia de detección es una inmunoglobulina de cabra o de polluelo anti IgG, conjugada con una sustancia fluorescente.

25 13. Método según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque por lo menos un antígeno vacunal es un antígeno microbiano corpuscular constituido por un microbio entero desactivado o fracción de microbio, preferentemente fijado sobre el sólido mediante simple depósito y adsorción física o unión fisicoquímica con el soporte, preferentemente en mezcla con un ligante proteico.

30 14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque dichos antígenos corpusculares vacunales y/o de control están asociados a un colorante, preferentemente un colorante fluorescente.

35 15. Método según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque dicho ligante proteico se selecciona de entre la yema de huevo, la gelatina, la albúmina de suero bovino o una IgG policlonal no humana, preferentemente de cabra.

40 16. Método según una de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque dicho antígeno vacunal corpuscular está mezclado con una inmunoglobulina de IgG policlonal de cabra.

45 17. Método según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque se utiliza como soporte sólido una lámina de vidrio o de plástico, o un pocillo de fondo plano de placa de microtitulación de vidrio o de plástico.

50 18. Método según una de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque se recoge un volumen determinado de sangre total con la ayuda de un tubo capilar en un frasco que contiene un volumen determinado de un tampón que permite la elución del suero, siendo el suero entonces diluido preferentemente a una concentración determinada, preferentemente de 1/100 a 1/20, y se deposita un volumen determinado de suero así diluido sobre diferentes zonas de depósito de dichos antígenos de control y antígenos vacunales sobre dicho soporte sólido.

55 19. Método según una de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque, para cada detección y, llegado el caso, cuantificación de un antígeno vacunal, se realizan las mediciones siguientes:

60 1- una primera medición de un primer valor representativo de la cantidad de un primer elemento de marcado preferentemente el primer valor de la intensidad de una señal emitida por dicho primer elemento de marcado fluorescente, fijándose dicho primer elemento de marcado de manera no específica sobre cualquier proteína en la zona de depósito de dicho antígeno vacunal, y

2- una segunda medición de un segundo valor representativo de la cantidad de un segundo elemento de marcado diferente de dicho primer elemento de marcado y que emite una señal diferente, preferentemente un segundo valor de la intensidad de la señal emitida por este segundo elemento de marcado fluorescente a una longitud de onda de excitación diferente de la de dicho primer elemento de marcado fluorescente, siendo dicho segundo elemento de marcado el elemento de marcado de dicha sustancia de detección de dicho antígeno vacunal, en la zona de depósito de dicho antígeno, y

3- se calcula la relación de dicho primer y segundo valores, y

60 4- se compara el valor de dicha relación con la de una relación de referencia obtenida con una colección de sueros de referencia positivos y negativos, permitiendo así mediante comparación determinar la necesidad o no de vacunar a la persona para dicho antígeno según el valor de la relación de dichos primer y segundo valores.

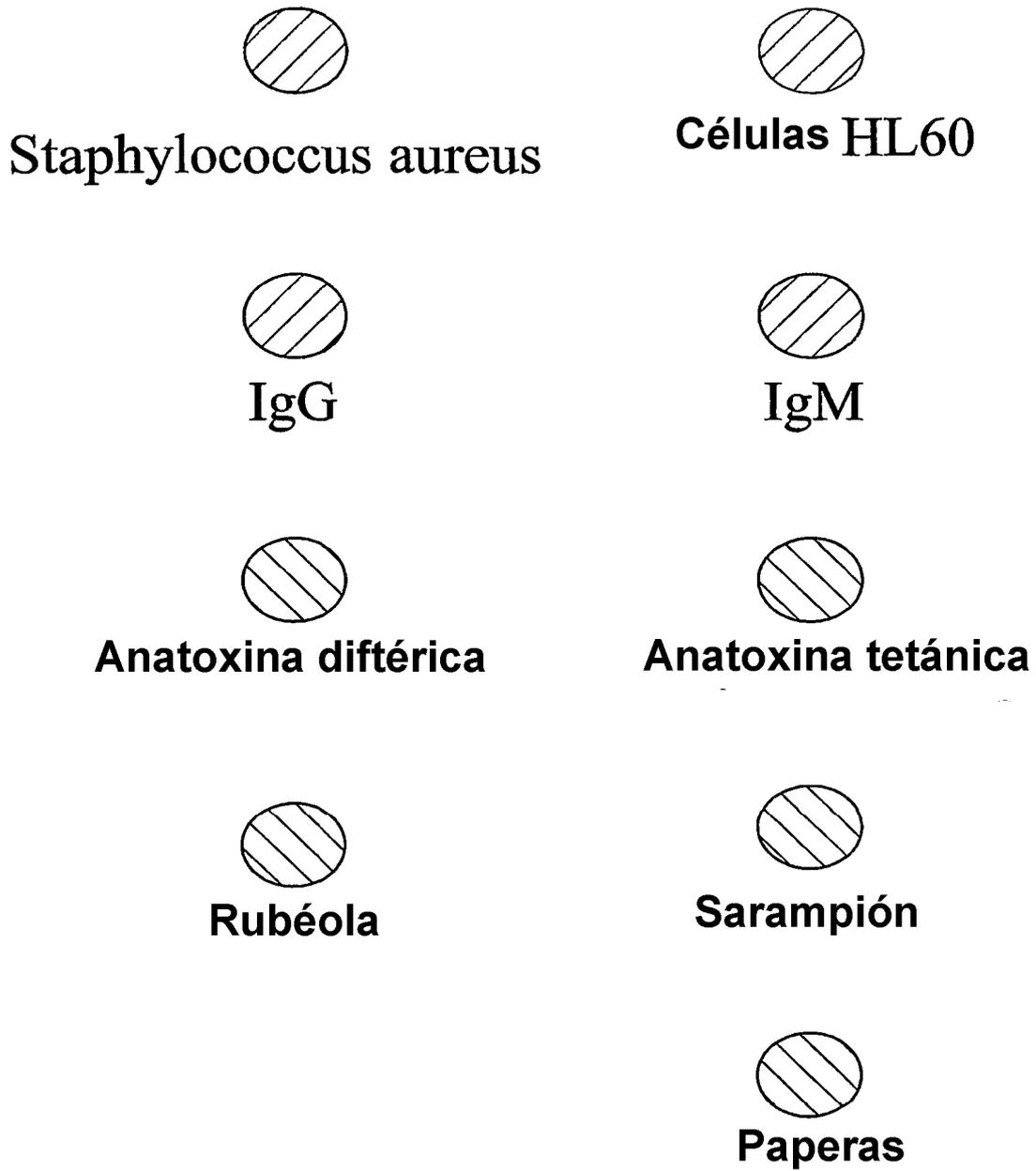


FIG.1

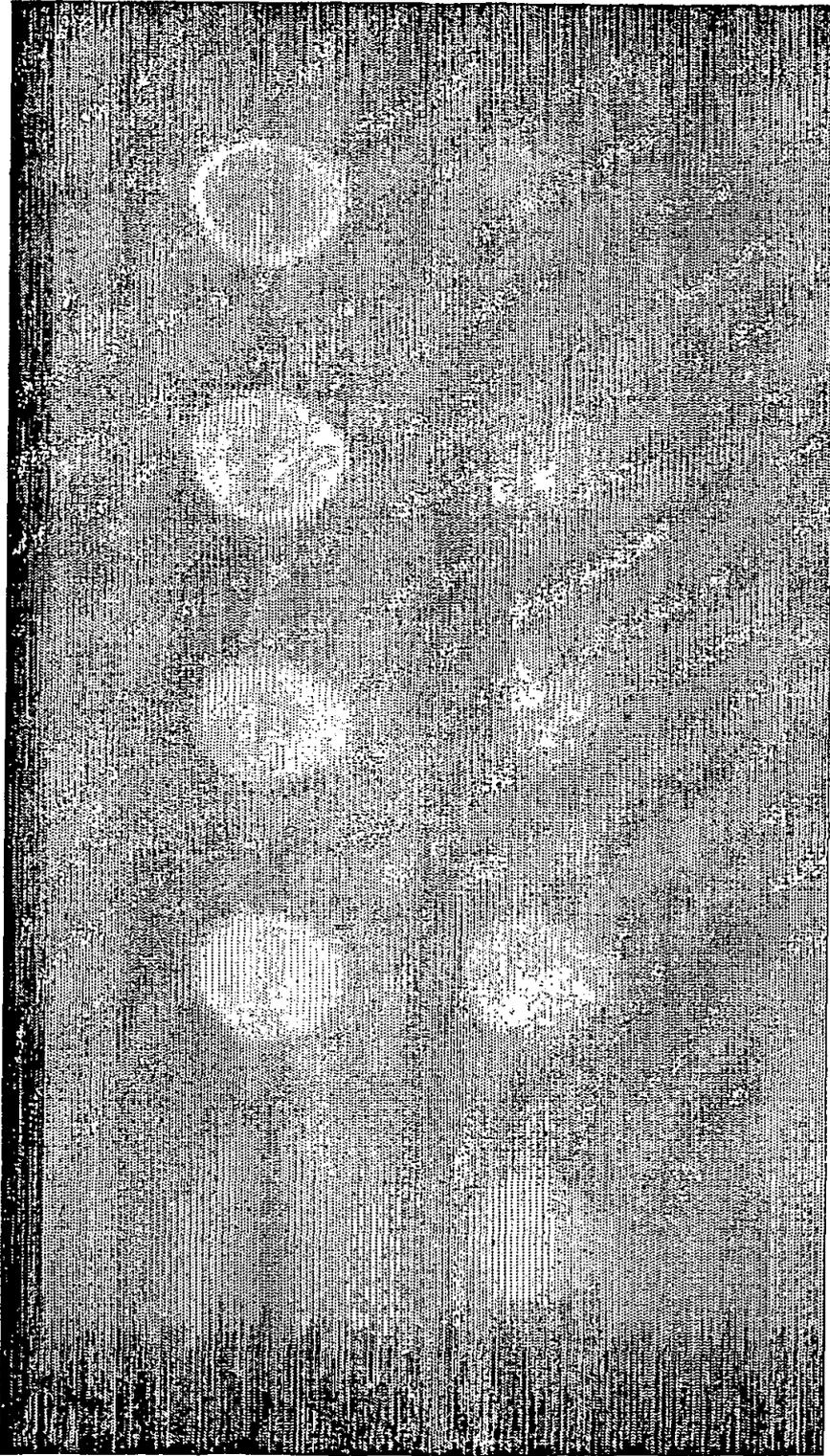


FIG.2