(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 372 359**

(51) Int. CI.:
C07K 14/195 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **09009877 .3**
(96) Fecha de presentación: **31.03.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2112158**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2009**

(54) Título: **DETECCIÓN DE INFECCIONES PRIMARIAS POR PATÓGENOS.**

(30) Prioridad:
20.04.2007 EP 07008124

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.01.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.01.2012

(73) Titular/es:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH

(72) Inventor/es:
Faatz, Elke, Dr.;
Schaarschmidt, Peter, Dr.;
Scholz, Christian, Dr. y
Schmitt, Urban

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Detección de infecciones primarias por patógenos

La presente invención se refiere a un método para detectar y determinar diferencialmente los anticuerpos IgM que resultan de una infección por un patógeno. Además, se proporcionan los reactivos de ensayo para llevar a cabo dicho método.

Aparte de la tecnología de PCR, los ensayos inmunológicos todavía desempeñan un importante papel en la serología de la infección. Mediante la determinación específica de las diferentes clases de inmunoglobulina, la inmunología permite analizar el estadio de una enfermedad. Mediante la determinación de los títulos de IgM y de IgG frente a determinados antígenos víricos, resulta posible distinguir entre diferentes estadios de infección, por ejemplo infecciones agudas, infecciones recurrente, infecciones crónicas/persistentes o estadios de enfermedad post-infecciosos. Por ejemplo, las moléculas de IgG contra las glucoproteínas víricas únicamente se generan en un estadio tardío de una infección por citomegalovirus (Schoppel *et al.*, JID 175:533-544, 1997; Eggers *et al.*, J. Med. Virol. 63:135-142, 2001).

Un aspecto crucial de una detección específica fiable de IgG e IgM en presencia de la otra clase de inmunoglobulina respectiva es la concentración efectiva de epítopos o la densidad efectiva de epítopos del antígeno de detección. Una concentración de epítopos efectiva elevada se refiere a una densidad de epítopos elevada y a que todos los epítopos son accesibles a la unión de anticuerpos. En contraste con lo anterior, también los agregados de polipéptidos presentan una elevada concentración de epítopos, aunque la concentración efectiva de epítopos es reducida debido a que los epítopos se encuentran parcial o completamente enterrados u ocultos y de esta manera no resultan accesibles a la unión de anticuerpos. Las concentraciones elevada de epítopos son una precondición para un reconocimiento específico de IgM, mientras que las concentraciones reducidas de epítopos son una precondición para el reconocimiento específico de IgG. En un ensayo clásico de IgM de tipo sándwich, que detecta moléculas de IgM contra el antígeno A, se utiliza un antígeno multimérico A como antígeno de captura inmovilizado. El mismo antígeno multimérico A que porta un grupo informador se utiliza como antígeno de detección. El analito IgM se une al antígeno de captura y al antígeno de detección, de manera que el grupo informador queda inmovilizado en una fase sólida (por ejemplo perlas recubiertas de estreptavidina). Con el fin de evitar interferencias de las moléculas de IgG dirigdas contra A, se añade al ensayo un antígeno monomérico A no marcado como agente de eliminación de interferencias (patente WO nº 98/23955, patente US nº 6.489.129 B1). De acuerdo con lo anterior, un ensayo específico de IgG de tipo sándwich (patentes WO nº 98/23961, US nº 6.645.732 B1) puede comprender un antígeno monomérico para la detección de IgG y un antígeno multimérico no marcado para evitar las interferencias con IgM.

El principio que permite una detección específica de moléculas de IgM y de IgG se basa en sus estructuras moleculares respectivas. La IgM pentamérica presenta diez paratopos idénticos para la unión de antígenos, mientras que la IgG monomérica presenta únicamente dos sitios de unión en cada molécula. La detección de IgG se basa en la afinidad para el analito, mientras que la detección de IgM se basa en su avidez. En el primer caso, la unión se consigue mediante una interacción de alta afinidad entre epítopo y paratopo (es decir, sitio de unión de antígeno de IgG); en el último caso, se consigue mediante una potenciación cooperativa de varias interacciones de baja afinidad ("avidez" se refiere a que las constantes individuales de disociación no se suman sino que se multiplican, es decir, una interacción relativamente débil, con una k_D de ~10^{-5} M resulta incrementada por dos sucesos independientes de unión, rindiendo una interacción de alta afinidad, con una k_D de ~ 10^{-10} M). De esta manera, puede afirmarse como regla general que los antígenos monoméricos se utilizan para la detección de IgG y se utilizan antígenos oligoméricos/multiméricos para la detección de IgM.

La oligomerización o multimerización de antígenos puede conseguirse mediante entrecruzamiento químico de antígenos monoméricos con entrecruzantes homobifuncionales o heterobifuncionales. Generalmente, la oligomerización o multimerización puede optimizarse mediante el ajuste de las condiciones de reacción (concentración de proteínas y entrecruzante, pH, temperatura, tasa de agitación y tiempo de reacción), lo que consume mucho tiempo y resulta laborioso. Sin embargo, pueden alcanzarse diferentes grados de entrecruzamiento en diferentes lotes, lo que requiere procedimientos posteriores de fraccionamiento y/o de calibración. Además, un grado más alto de entrecruzamiento normalmente conduce a una reducción de la solubilidad, conduciendo a problemas en el rendimiento del ensayo. De esta manera, se desea encontrar un método mejorado para proporcionar antígenos multiméricos de un modo definido y reproducible.

La patente US nº 6.207.420 describe una secuencia de fusión que comprende una proteína portadora que comprende una proteína de *E. coli* que presenta una probabilidad de solubilidad predicha de por lo menos 90% fusionada con un péptido o proteína heteróloga diana. Preferentemente, el péptido o proteína heteróloga normalmente es insoluble al expresarse en bacterias.

La patente WO nº 03/000878 describe una proteína de fusión que comprende por lo menos un polipéptido diana y cadena arriba del mismo por lo menos un chaperón de FKBP, que se selecciona de entre el grupo que consiste de FkpA, SlyD y factor inductor. El polipéptido diana puede ser un producto génico de mamífero o un producto génico de un patógeno de mamífero.

La presente invención se refiere a un método y a un reactivo de ensayo para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno según definen las reivindicaciones.

También se da a conocer un polipéptido de fusión que comprende:
(i) por lo menos un dominio de multimerización y
(ii) una pluralidad de copias de un segmento epítopo procedente de un patógeno.

Las moléculas de polipéptido de fusión son capaces de formar un multímero. Un multímero comprende una pluralidad de subunidades monoméricas asociadas mediante interacciones no covalentes a través del dominio de multimerización. El multímero puede formarse mediante, por ejemplo, incubación de moléculas de polipéptido de fusión bajo condiciones adecuadas. Los polipéptidos de fusión son fusiones genéticas que pueden producirse en cantidades elevadas y de calidad reproducible según métodos estándares. Los polipéptidos de fusión y los multímeros formados a partir de los mismos presentan elevadas estabilidad y solubilidad y, de esta manera, son excelentes antígenos de ensayo en métodos de detección de anticuerpos que resultan de una infección por un patógeno. Preferentemente, los polipéptidos de fusión se utilizan en una determinación de anticuerpos IgM, más preferentemente en una determinación diferencial de anticuerpos IgM, todavía más preferentemente en una determinación diferencial de anticuerpos IgM tempranos que se producen en una infección aguda y/o primaria. Los polipéptidos de fusión pueden portar grupos informadores y/o grupos de captura y de esta manera pueden utilizarse como antígenos de detección y/o de captura. Además, los polipéptidos de fusión también resultan adecuados como agentes de eliminación de interferencias.

Las moléculas de polipéptido de fusión preferentemente comprenden uno o más dominios de multimerización, más preferentemente un dominio de multimerización. El dominio de multimerización preferentemente se localiza en el extremo N-terminal y/o C-terminal del polipéptido de fusión, más preferentemente en el extremo N-terminal. El dominio de multimerización es una secuencia polipeptídica que permite la multimerización de molécula individuales de polipéptido de fusión, en la que se forma un multímero que comprende una pluralidad de subunidades monoméricas, que se asocian mediante interacciones no covalentes. Las subunidades monoméricas del complejo son proteínas de fusión genética, en las que los residuos aminoácidos individuales se unen mediante enlaces peptídicos. Las subunidades monoméricas del multímero preferentemente son idénticas.

Por ejemplo, el dominio de multimerización puede ser un dominio de dimerización, es decir, un dominio que permita la asociación no covalente de dos subunidades; un dominio de trimerización, que permita la asociación no covalente de tres subunidades; un dominio de tetramerización o un dominio de multimerización de orden todavía más alto. Preferentemente, el dominio de multimerización es un dominio de dimerización, un dominio de trimerización o un dominio de tetramerización.

Los dominios de multimerización pueden seleccionarse de entre chaperones procarióticos o eucarióticos, preferentemente de entre chaperones independientes de ATP. Son ejemplos específicos de dominios de multimerización las proteínas FkpA, Skp y Sec de *E. coli* o los ortólogos de las mismas procedentes de otros organismos procarióticos. FkpA es un chaperón de dimerización periplásmico independiente de ATP de *E. coli*. Skp es un chaperón de trimerización periplásmico independiente de ATP de *E. coli*. SecB es un chaperón de tetramerización citosólico independiente de ATP de *E. coli*. Algunos dominios de multimerización adecuados adicionales son las proteínas de choque térmico de organismos eucarióticos o procarióticos, por ejemplo Hsp25, un chaperón oligomérico citosólico/nuclear eucariótico independiente de ATP. Un dominio de multimerización adecuado adicional es MIP (potenciador de infectividad de macrófagos), un chaperón de dimerización independiente de ATP estructuralmente relacionado con FkpA. Los chaperones dependientes de ATP, tales como GroEL, un chaperón de heptamerización citosólico dependiente de ATP de *E. coli*, ClpB, un chaperón de hexamerización dependiente de ATP de *E. coli*, o ClpX, también resultan adecuados. Además, los dominios de multimerización pueden seleccionarse de entre fragmentos o variantes de los polipéptidos anteriormente indicados que conserven su capacidad de formación de multímero.

El polipéptido de fusión indicado en la presente memoria comprende una pluralidad de copias de un segmento epítopo. Un segmento epítopo comprende una secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo. De esta manera, el polipéptido comprende múltiples sitios de unión para un anticuerpo que reconoce el epítopo respectivo. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de los segmentos de epítopo individuales es idéntica o sustancialmente idéntica. Sin embargo, resulta posible que uno o más de los segmentos de epítopo sean diferentes con la condición de que estas diferencias no afecten negativamente al reconocimiento por parte de los anticuerpos

que deben detectarse. El polipéptido de fusión comprende por lo menos 2, preferentemente 2 a 10, más preferentemente 2 a 6, y todavía más preferentemente 2, 3, 4, 5 ó 6 copias de los segmentos de epítopo.

Un multímero que consiste de una pluralidad de subunidades individuales de polipéptido de fusión preferentemente comprende por lo menos 4, más preferentemente por lo menos 6, y todavía más preferentemente por lo menos 8 copias de un segmento de epítopo. El multímero puede comprender, por ejemplo, hasta 40, preferentemente hasta 30, y todavía más preferentemente hasta 25 copias de un segmento de epítopo.

Habitualmente, el polipéptido de fusión comprende una pluralidad de copias de únicamente un solo segmento epítopo. En este caso, el polipéptido de fusión presenta una única especificidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, se contempla, sin embargo, que el polipéptido de fusión comprende una pluralidad de copias de dos o más segmentos de epítopo diferentes, preferentemente de dos segmentos de epítopo diferentes. En este caso, el polipéptido de fusión resulta adecuado para la detección de varios tipos de especificidad de anticuerpo.

La longitud de un segmento epítopo habitualmente es de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente de por lo menos 6 aminoácidos y más preferentemente de por lo menos 8 aminoácidos. La longitud máxima del segmento de epítopo habitualmente es de entre 100 y 120 aminoácidos, preferentemente de 80 aminoácidos y más preferentemente de 70 aminoácidos. Más preferentemente, el segmento de epítopo presenta una longitud de entre 15 y 50 aminoácidos.

Los segmentos epítopo individuales en el polipéptido de fusión pueden encontrarse separadas por secuencias espaciadoras. Las secuencias de espaciador preferentemente son secuencias que son heterólogas respecto al organismo patogénico a partir del que se derivó el segmento de epítopo. A efectos prácticos, las secuencias de espaciador se seleccionan de entre las secuencias que interfieren poco o nada con la utilización del polipéptido de fusión como antígeno de ensayo en la determinación de anticuerpos. Lo anterior implica que las secuencias de espaciador son reactivas no inmunológicamente contra los anticuerpos que deben someterse a ensayo. Preferentemente, las secuencias espaciadoras comprenden residuos de glicina y/o serina. Resultan especialmente preferentes las secuencias espaciadoras de poliglicina. La longitud de las secuencias espaciadoras preferentemente son de entre 1 y 10 aminoácidos, más preferentemente de entre 2 y 5 aminoácidos y todavía más preferentemente de 3 ó 4 aminoácidos. Resulta especialmente preferente una secuencia espaciadora $(Gly)_3$.

Además, puede encontrarse presente una secuencia espaciadora entre un dominio de multimerización y los segmentos epítopo. Esta secuencia espaciadora puede presentar una longitud de, por ejemplo, 1 a 100 aminoácidos. Preferentemente, dicha secuencia espaciadora es heteróloga respecto al dominio de multimerización y al segmento de epítopo. Preferentemente, la secuencia espaciadora es tal como se ha indicado anteriormente.

Los segmentos epítopo del polipéptido de fusión son secuencias de antígeno de un patógeno que son capaces de unirse a anticuerpos cultivados durante el curso de una reacción inmunológica por parte de un organismo infectado por el patógeno. Las secuencias de epítopo preferentemente se seleccionan para ser reconocidas por anticuerpos presentes en estadios específicos de la infección, por ejemplo los epítopos "tempranos", que son reconocidos preferentemente por los anticuerpos durante un estado de infección temprano, o los epítopos "tardíos", que son reconocidos preferentemente en un estadio posterior de la infección. En una realización preferente, el segmento epítopo comprende un epítopo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos presentes en una etapa temprana y/o aguda de una infección por dicho patógeno. En una realización especialmente preferente, el segmento de epítopo comprende un epítopo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos presentes en una etapa temprana y/o aguda de una infección primaria por dicho patógeno. En una realización todavía adicional, el segmento de epítopo comprende un epítopo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos presentes en una etapa tardía de una infección por dicho patógeno o en una infección pasada. En todavía otra realización, el segmento de epítopo comprende un epítopo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos presentes en una infección persistente o recurrente por dicho patógeno.

El segmento epítopo puede derivarse a partir de cualquier patógeno vírico, bacteriano o protozoario, que resulte capaz de causar una reacción inmunológica detectable, es decir, una generación de anticuerpos, particularmente anticuerpos IgM, como resultado de una infección. Por ejemplo, el patógeno se selecciona de entre el grupo que consiste de:

(i) virus herpes tales como los virus humanos del Herpes simplex de tipos 1 y 2 (HHV1 y HHV2), el virus de la varicela zóster (HHV3), el virus de Epstein-Barr (HHV4/EBV) o el citomegalovirus humano (HHV5) y los virus humanos del herpes de tipos 6, 7 y 8,
(ii) el virus de la rubéola,
(iii) los virus de la hepatitis, tales como el virus de la hepatitis A (VAH), el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC),

(iv) paramixovirus, tales como el virus del sarampión o de la parotiditis; (v) un organismo *Toxoplasma*, y (vi) un organismo *Borrelia*.

Se han descrito ejemplos de epítopos adecuados de dichos patógenos en numerosos documentos, tal como se describe en detalle posteriormente. Dichos documentos y las referencias citadas en los mismos se incorporan como referencia en la presente memoria.

La detección específica de moléculas de IgM indicativa de una infección temprana resulta clínicamente importante para muchas infecciones víricas, bacterianas y protozoarias en el ser humano. La familia de los virus herpes, por ejemplo, comprende el virus del Herpes simplex de tipos 1 y 2 (HHV1 y HHV2), el virus de la varicela zóster (HHV3), el virus de Epstein-Barr (HHV4), el citomegalovirus humano (HHV5) y los virus herpes humanos de tipos 6, 7 y 8. El citomegalovirus humano (HHV5) desempeña un papel clave en los diagnósticos rutinarios de embarazo. Puede provocar daños devastadores en el feto en el caso de que una mujer gestante sin inmunidad humoral o celular contra el virus pase una infección primaria durante el primer trimestre de la gestación.

Por medio del mapado de epítopos, se ha identificado una pluralidad de determinantes inmunológicos cruciales en diferentes antígenos del herpes. Por ejemplo, las reactividades de anticuerpo de epítopos individuales en los antígenos del HCMV pp150, p52, gB y pp28 se resumen en Greijer *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37(1):179-188, 1999. Se describen epítopos adicionales en Schoppel *et al.*, J. Infect. Dis. 175(3):533-544, 1997. Respecto al virus del Herpes simplex, se han localizado epítopos inmunodominantes en la secuencia 552 a 578 de la glucoproteína madura G del HSV-2 (Marsden *et al.*, J. Med. Virol. 56:79-84, 1998; Liljeqvist *et al.*, J. Gen. Virol. 79:1215-1224, 1998) y en la secuencia 112 a 127 de la glucoproteína G1 del HSV-1 (Tunbäck *et al.*, J. Gen. Virol. 81:1033-1040, 2000), respectivamente. Dichos epítopos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión indicados en la presente memoria.

Toxoplasma gondii y el virus de la rubéola conjuntamente con el citomegalovirus humano y los virus del Herpes simplex de tipos 1 y 2 constituyen la familia TORCH y presentan funciones importantes como parámetros en los exámenes de seguimiento del embarazo. Las infecciones primarias de mujeres gestantes (que no presentan inmunidad ni humoral ni celular) por dichos patógenos durante el primer trimestre de gestación puede conducir a daños severos en el feto. Ello requiere un diagnóstico diferencial fiable que discrimine entre las infecciones primarias y las recurrentes. Tal como se ha indicado anteriormente, los determinantes inmunodominantes dentro de varios antígenos del HCMV son bien conocidos en la literatura, por ejemplo las secuencias 595 a 636 y 1.011 a 1.048 de pp150, las secuencias 266 a 293 y 295 a 312 de p52, las secuencias 792 a 809 y 60 a 81 de la glucoproteína B y las secuencias 15 a 45 y 130 a 160 de pp28 (Greijer *et al.*, *supra*). De manera similar, se han identificado epítopos en la proteína E1 inmunodominante de cubierta del virus de la rubéola. Por ejemplo, la región entre los aminoácidos 243 a 286 contiene tres epítopos neutralizadores, tal como informa Terry *et al.* (Terry *et al.*, Arch. Virol. 98:189-197, 1988). Otro epítopo E1 neutralizador ha sido caracterizado en la región entre los aminoácidos 213 a 239 (Mitchell *et al.*, J. Clin. Microbiol. 30(7):1841-1847, 1992). Se ha identificado por lo menos un epítopo inmunodominante con capacidad neutralizante en una segunda proteína de cubierta del virus de la rubéola, E2 (Green y Dorsett, J. Virol. 57(3):893-898, 1986). Un epítopo inmunodominante de células T y varios epítopos lineales de células B han sido localizados en la región 31 a 105 de E2 (McCarthy *et al.*, J. Virol. 67(2):673-681, 1993; Wolinsky *et al.*, J. Virol. 65:3986-3994, 1991). Estos epítopos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión indicados en la presente memoria.

Se han identificado varias proteínas de *Toxoplasma gondii* como antígenos inmunodominantes: las proteínas de gránulos densos GRA1 (p24), GRA2 (p28), GRA4 (p41), GRA6 (p32), GRA7 (p29) y GRA8 (p35), los antígenos de superficie SAG1 (p30) y SAG2 (p22), los antígenos de rhoptry ROP1 (p66) y ROP2 (p54), la proteína de matriz MAG1 (p65) y las proteínas de micronema MIC3 y MIC5 (Pfrepper *et al.*, Clin. Diagn. Lamb. Immunol. 12(8):977-982, 2005). Para la detección de los anticuerpos IgM anti-toxoplasma, se ha sugerido anteriormente una combinación de GRA7, GRA8 y ROP1 (Aubert *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38:1144-1150, 2000). 1144-1150). Dichos epítopos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión indicados en la presente memoria.

Otro importante campo de la serología cubre los virus de la hepatitis, tales como HAV, HBV y HCV. Los antígenos inmunodominantes y los epítopos inmunodominantes respectivos son bien conocidos para cada uno de dichos patógenos. Por ejemplo, la proteína de nucleocápside del HBV es la diana principal de la respuesta inmunológica del huésped en la hepatitis B crónica, y se han caracterizado varios epítopos inmunodominantes. Los epítopos de células B importantes del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) han sido localizados en los aminoácidos 74 a 89, 130 a 138 (Salfeld *et al.*, J. Virol. 63:798-808, 1989, y 107 a 118 (Colucci *et al.*, J. Immunol. 141:4376-4380, 1988). Dichos epítopos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión indicados en la presente memoria.

Los epítopos inmunodominantes han sido caracterizados para una pluralidad de antígenos de la hepatitis C (resumidos en Carlos *et al.*, Clin. Immunol. 111:22-27, 2004). Por ejemplo, han sido definidos los epítopos de las regiones inmunodominantes de Core (7 a 18), E2 (484 a 499), NS3 (1.248 a 1.265) y NS4 (1.767 a 1.786), así como

los epítopos de las regiones hipervariables de E2 del HVR1 de genotipo 1a (386 a 406), de E2 del HVR2 de genotipo 1a (472 a 485), de E2 del HVR1 de genotipo 1b (386 a 406) y de E2 del HVR2 de genotipo 1b (472 a 485). Dichos epítopos y otros epítopos del HCV pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión indicados en la presente memoria y seguramente demostrarán ser útiles en el desarrollo de un inmunoensayo diferencial de IgM según la presente invención.

Otros patógenos humanos importantes son el virus del sarampión y el virus de la parotiditis, ambos pertenecientes a la familia de los paramixovirus y consistentes cada uno de seis proteínas estructurales. La proteína N de nucleocápside del virus del sarampión es la diana principal de la respuesta inmunológica humoral, y la respuesta de las células B contra N resulta crucial en el control de la infección del sarampión. Recientemente, los epítopos inmunodominantes han sido localizados dentro del extremo C-terminal del antígeno N entre los aminoácidos 419 y 525. En particular, ha podido localizarse un epítopo lineal dentro de una secuencia de 440 a 448 (Zvirbliene *et al.*, Arch. Virol. 152:25-39, 2007). De manera similar, la proteína NP asociada a la nucleocápside del virus de la parotiditis constituye el determinante antigénico principal, y las variantes recombinantes de NP muestran una elevada antigenicidad y son muy adecuados para la detección específica de IgM en la serología de la parotiditis (Samuel *et al.*, J. Med. Virol. 66:123-130, 2002). El inmunodiagnóstico de *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii* y *B. afzelli*) ha despertado un interés creciente debido a la imparable expansión de esta espiroqueta. Debido a los inviernos suaves que se esperan con el cambio climático, se cree que el impacto de *Borrelia* se incrementará todavía más en el futuro cercano. Se ha descrito una región conservada inmunodominante del antígeno VisE de *Borrelia burgdorferi* que resulta muy adecuada para el serodiagnóstico sensible y específico (Liang *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37(12):3990-3996, 1999). La región denominada IR6 ó C6 (Liang y Philipp, Infect. Immun. 67:6702-6706, 1999; Liang *et al.*, J. Immunol. 163(10):5566-5573, 1999) comprende un segmento invariable de 26 aminoácidos que puede incorporarse en los polipéptidos de fusión indicados en la presente memoria.

El polipéptido de fusión preferentemente se utiliza como reactivo de ensayo en un método para detectar un anticuerpo, particularmente un anticuerpo IgM en una muestra. Con este fin, la proteína de fusión puede portar grupos informadores y/o de acoplamiento. Son ejemplos de grupos informadores adecuados, grupos detectables por medios ópticos, por ejemplo grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, por ejemplo grupos quimioluminiscentes, o grupos particulados, tales como partículas de metal, por ejemplo de oro, o partículas de látex. Evidentemente también se encuentran disponibles grupos informadores adecuados, tales como grupos enzimáticos, grupos radioactivos, grupos haptenos, etc. Son especialmente preferentes los grupos informadores de electroquimioluminiscencia, particularmente grupos de rutenio, tales como los grupos $(bipiridina)_3$ de rutenio o $(fenantrolina)_3$ de rutenio. También resultan especialmente preferentes los grupos informadores hapteno, tales como los grupos digoxigenina, que pueden detectarse con un anticuerpo anti-hapteno tal como un anticuerpo anti-digoxigenina.

En una realización adicional, el polipéptido de fusión puede portar por lo menos un grupo de acoplamiento. Un grupo de acoplamiento es un grupo para el acoplamiento del polipéptido de fusión con un compuesto o sustancial adicional, por ejemplo una fase sólida o un grupo informador tal como se ha definido anteriormente. El grupo de acoplamiento puede ser un grupo para el acoplamiento covalente o para el acoplamiento no covalente. Preferentemente, el grupo de acoplamiento es una primera pareja de una pareja de unión específica, que interactúa específicamente con la segunda pareja de la pareja de unión. Las parejas de unión preferentes son biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/anticuerpo antibiotina, hapteno/anticuerpo antihapteno y carbohidrato/lectina. Preferentemente, el grupo de acoplamiento es un grupo biotina que incluye derivados de biotina, es decir, compuestos relacionados estructuralmente con biotina que conservan la capacidad de unirse a estreptavidina y/o a avidina.

El polipéptido de fusión puede unirse a grupos informadores y/o de acoplamiento según medios convencionales. Por ejemplo, pueden prepararse reactivos de conjugación que comprenden grupos informadores y/o de acoplamiento. Estos reactivos pueden comprender además un grupo que puede reaccionar con grupos presentes en el polipéptido, por ejemplo grupos hidroxi, amino, carboxi y/o tio. Son ejemplos específicos de grupos de acoplamiento los grupos éster activos, por ejemplo grupos N-hidroxisuccinimida o grupos maleimida.

Se da a conocer adicionalmente una molécula de ácido nucleico codificante de un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente. La molécula de ácidos nucleicos preferentemente es una molécula de ADN. Con el fin de incrementar la estabilidad de la molécula de ácidos nucleicos, resulta preferente que las partes de la misma codificantes de los segmentos individuales de epítopo (que preferentemente son idénticos a nivel de aminoácidos) presenten una secuencia de nucleótidos diferente dentro del alcance de la degeneración del código genético, en los que se utilizan diferentes codones tripletes de nucleótidos codificantes de los mismos aminoácidos. Más preferentemente, cada parte codificante de un segmento individual de epítopo idéntico presenta una secuencia de nucleótidos que es diferente de las demás partes.

Se describe además un vector de expresión que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico tal como se ha indicado anteriormente operablemente ligada a una secuencia de control de la expresión. El vector de expresión puede ser un vector procariótico o eucariótico que comprenda además elementos genéticos para el mantenimiento y la propagación en la célula huésped respectiva, tal como un origen de replicación y/o genes marcadores de selección. La secuencia de control de la expresión puede ser una secuencia de control de la expresión procariótica o eucariótica que sea constitutiva o inducible. La secuencia de control de la expresión se selecciona para permitir la expresión eficiente en una célula huésped deseada. Los ejemplos de vectores de expresión y secuencias de control de la expresión adecuados son conocidos por el experto en la materia y se describen en libros de texto estándares, tales como Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, 1989, o se encuentran disponibles comercialmente.

Se describe adicionalmente una célula huésped transfectada o transformada con una molécula de ácido nucleico o un vector de expresión tal como se ha indicado anteriormente. La célula huésped puede ser una célula procariótica, por ejemplo una célula bacteriana Gram-negativa tal como *E. coli*, o una célula eucariótica, por ejemplo una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero. La célula huésped puede utilizarse para la preparación recombinante de un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente. Preferentemente, la producción recombinante comprende las etapas siguientes:

(i) proporcionar una célula huésped tal como se ha indicado anteriormente,
(ii) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones en las que se expresa el polipéptido de fusión, y
(iii) aislar dicho polipéptido de fusión.

Tal como se ha indicado anteriormente, el polipéptido de fusión indicado en la presente memoria preferentemente se utiliza como reactivo de detección en un método para detectar un anticuerpo en una muestra. El anticuerpo preferentemente es un anticuerpo IgM. Más preferentemente, la detección comprende una determinación diferencial de anticuerpos IgM. En una realización especialmente preferente, el anticuerpo es un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección, particularmente de una infección primaria por un patógeno.

En una realización adicional, el polipéptido de fusión puede utilizarse como reactivo de eliminación de interferencias en un método para detectar un anticuerpo en una muestra. En la presente realización, el anticuerpo preferentemente es un anticuerpo IgG.

La invención también se refiere a un kit de reactivos de ensayo para detectar un anticuerpo en una muestra, que comprende por lo menos un polipéptido de fusión y componentes de ensayo adicionales. El reactivo de ensayo puede comprender un único polipéptido de fusión que comprende un único tipo de epítopos, o un único polipéptido de fusión que comprende dos o más tipos diferentes de epítopo, o dos o más polipéptidos de fusión que comprende un único tipo de epítopo o dos o más tipos diferentes de epítopo. El polipéptido de fusión de la invención puede ser un reactivo de detección o un reactivo de eliminación de interferencias. En el caso de que el polipéptido de fusión sea un reactivo de detección, preferentemente comprende grupos informadores y/o de acoplamiento tal como se ha indicado anteriormente. En el caso de que el polipéptido de fusión sea un reactivo de eliminación de interferencias, preferentemente no comprende ningún grupo informador. El reactivo de eliminación de interferencias se caracteriza porque su concentración o densidad efectiva de epítopos difiere de la concentración efectiva de epítopos del reactivo de detección. Preferentemente, la concentración de epítopos o la densidad de epítopos del reactivo de eliminación de interferencias es más baja que la del reactivo de detección.

También se da a conocer un método para detectar un anticuerpo dirigido contra un organismo patogénico en una muestra, que comprende las etapas siguientes:

(a) incubación de dicha muestra con un reactivo de ensayo que comprende por lo menos un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente y componentes de ensayo adicionales, y
(b) determinación de la presencia y/o concentración de dicho anticuerpo en dicha muestra mediante la evaluación de la reacción de los componentes de la muestra con el reactivo de ensayo.

La invención se refiere a un método para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en la que la muestra puede comprender un anticuerpo interfiriente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interfiriente y/o un anticuerpo IgG interfiriente, comprendiendo las etapas:

(a) incubar dicha muestra con un reactivo de ensayo, que comprende:
(i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a los anticuerpos IgM,
(ii) por lo menos un receptor R^2, que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, en el que R^2 es un antígeno multimérico y porta un grupo informador,
(iii) por lo menos un receptor R^3, que se une específicamente al anticuerpo IgM interfiriente, en el que R3 es un antígeno multimérico con una densidad o concentración efectivas de epítopos que es por lo menos dos

veces inferior a la densidad o concentración de epítopos del receptor R^2, y
(iv) opcionalmente un receptor R^4 que se une específicamente a un anticuerpo IgM, en el que R^4 es un antígeno monomérico que comprende una única copia de epítopo,
(b) permitiendo que se formen los complejos siguientes:
(i) un complejo que comprende R^1, dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente y R^2, portando dicho complejo un grupo informador,
(ii) opcionalmente un complejo que comprende R^3 y dicho anticuerpo IgM interfiriente, eliminando de esta manera la unión interfiriente de dicho anticuerpo IgM interfiriente a R^2,
(iii) opcionalmente un complejo que comprende R^4 y dicho anticuerpo IgG interfiriente, eliminando de esta manera la unión interfiriente de dicho anticuerpo IgG interfiriente a R^2, y determinar dicho grupo informador unido mediante R^2 a dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente como medida de dicho anticuerpo IgM en dicha muestra.

Además, la invención se refiere a un reactivo de ensayo para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en la que la muestra puede comprender un anticuerpo interfiriente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interfiriente y/o un anticuerpo IgG interfiriente, comprendiendo:

(i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a los anticuerpos IgM,
(ii) por lo menos un receptor R^2, que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, en el que R^2 es un antígeno multimérico y porta un grupo informador,
(iii) por lo menos un receptor R^3, que se une específicamente al anticuerpo IgM interfiriente, en el que R3 es un antígeno multimérico con una densidad o concentración efectivas de epítopos que es por lo menos dos veces inferior a la densidad o concentración de epítopos del receptor R^2, y
(iv) opcionalmente un receptor R^4 que se une específicamente a un anticuerpo IgG, en el que R^4 es un antígeno monomérico que comprende una única copia de epítopo.

El reactivo de ensayo preferentemente comprende un reactivo de detección y por lo menos un reactivo de eliminación de interferencias, y el método comprende determinar la reacción de componentes deseados de la muestra, es decir, el tipo de anticuerpo que debe detectarse, con el reactivo de detección, en el que los componentes no deseados de la muestra, por ejemplo anticuerpos de una clase diferente, tal como anticuerpos IgG y/o IgM característicos de estadios de la infección no relevantes, se capturan con el reactivo o reactivos de eliminación de interferencias. El anticuerpo que debe detectarse es un anticuerpo IgM, más preferentemente un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana y/o aguda de una infección, particularmente de una infección primaria. En este caso, el reactivo de ensayo preferentemente comprende además un reactivo de eliminación de interferencias para capturar los anticuerpos IgG y/o un reactivo de eliminación de interferencias para capturar los anticuerpos IgM presentes en una etapa tardía de una infección y/o en una infección recurrente, en el que el reactivo de eliminación de interferencias no porta un grupo informador. El reactivo de eliminación de interferencias se caracteriza porque su concentración o densidad efectiva de epítopos difiere de la concentración o densidad efectiva de epítopos del reactivo de detección. En el caso de que el reactivo de detección se proporcione para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana y/o aguda de una infección, la concentración o densidad efectiva de epítopos del reactivo de eliminación de interferencias es más baja. Por ejemplo, la concentración o densidad de epítopos del reactivo de eliminación de interferencias no debería exceder el cincuenta por ciento de la densidad de epítopos del reactivo de detección.

Preferentemente, la muestra se preincuba con el reactivo o reactivos de eliminación de interferencias antes de ponerlos en contacto con el reactivo de detección.

Son ejemplos de reactivos de eliminación de interferencias con IgG, los antígenos que comprenden fragmentos que comprenden epítopos monoméricos. En una realización preferente, los reactivos de eliminación de interferencias de IgG son polipéptidos de fusión que comprenden un dominio chaperón monomérico, tal como SlyD de *E. coli*, y una única copia de un fragmento que comprende epítopos procedentes del patógeno. El epítopo presente en el reactivo de eliminación de interferencias de IgG puede ser igual al presente en el reactivo de detección.

Son ejemplos de reactivos de eliminación de interferencias para capturar, y de esta manera inactivar, anticuerpos IgM tardíos, los antígenos multiméricos que comprenden una pluralidad de epítopos. En la presente realización, el reactivo de eliminación de interferencias, sin embargo, comprende un número inferior de epítopos que el reactivo de detección. Preferentemente, el reactivo de eliminación de interferencias comprende por lo menos dos epítopos y hasta la mitad del número de epítopos del reactivo de detección respectivo. Inesperadamente se ha encontrado que dicho reactivo multimérico de eliminación de interferencias es capaz de capturar, y de esta manera inactivar los anticuerpos IgM tardíos, que se encontró que presentaban una afinidad más alta respecto al epítopo que los anticuerpos tempranos que debían detectarse sin presentar un efecto negativo significativo sobre la detección de los anticuerpos IgM tempranos deseados. De esta manera, por ejemplo, el reactivo de eliminación de interferencias de

IgM comprende 2 a 6, por ejemplo 2, 3, 4 ó 6 copias del epítopo, mientras que un reactivo de detección de IgM temprana puede comprender por lo menos 8, por ejemplo por lo menos 12 ó 16 copias del fragmento que comprende el epítopo. El agente de eliminación de interferencias puede ser, por ejemplo, un polipéptido de fusión que comprende un dominio chaperón monomérico, tal como SlyD, y una pluralidad de epítopos, o un polipéptido de fusión que comprenda un dominio de multimerización y un único epítopo ó 2 copias del epítopo. El epítopo presente en el reactivo de eliminación de interferencias de IgG preferentemente puede ser igual al presente en el reactivo de detección.

El método de la invención preferentemente se lleva a cabo en forma de ensayo de doble antígeno de tipo sándwich, en el que el reactivo de ensayo comprende dos polipéptidos de fusión tal como se ha indicado anteriormente, en el que el primer polipéptido de fusión porta un grupo informador o porta un grupo de acoplamiento que puede unirse a un grupo informador. El segundo polipéptido de fusión se une a una fase sólida o porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida. En la presente realización, el analito anticuerpo se determina a partir de la formación de un complejo con el primer y segundo polipéptidos de fusión y la detección de dicho complejo en dicha fase sólida.

En una realización preferente adicional, el método de la invención puede llevarse a cabo en forma de un ensayo indirecto, en el que el reactivo de ensayo comprende un polipéptido de fusión, que porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida y un receptor que reconoce la clase de anticuerpo que debe determinarse, por ejemplo un anticuerpo anti-IgM humano, en el que el receptor porta un grupo informador y en el que el anticuerpo se determina mediante la formación de un complejo con el polipéptido de fusión y el receptor en una fase sólida. Alternativamente, el ensayo indirecto puede comprender la utilización de un receptor inmovilizado o inmovilizable y un polipéptido de fusión que comprende un grupo informador.

Tal como se ha explicado anteriormente, la presente invención permite el diagnóstico diferencial de los anticuerpos IgM. De esta manera, una realización adicional se refiere a una determinación específica de anticuerpos IgM que se produce en una etapa tardía de una infección y/o en una infección recurrente. En la presente realización, el reactivo de detección comprende por lo menos un antígeno multimérico que presenta una densidad de epítopos reducida tal como se ha indicado anteriormente, por ejemplo preferentemente un polipéptido de fusión que comprende 2 a 6, por ejemplo 2, 3, 4 ó 6 copias del epítopo, que podría resultar adecuado como reactivo de eliminación de interferencias en un ensayo para anticuerpos IgM "tempranos", pero que porta un grupo informador y/o de acoplamiento. Además, el ensayo preferentemente comprende un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgG tal como se ha indicado anteriormente y/o un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgM presentes en una etapa temprana de una infección, particularmente en una etapa temprana de una infección primaria y/o aguda. Preferentemente, el reactivo de eliminación de interferencias para los anticuerpos IgM "tempranos" corresponde al reactivo de ensayo para determinar anticuerpos IgM "tempranos" aunque sin grupos informadores. Alternativamente, una determinación diferencial de IgM puede llevarse a cabo mediante análisis diferencial, es decir un primer ensayo en presencia de un reactivo de ensayo para detectar únicamente un tipo de anticuerpos IgM (por ejemplo anticuerpos "tempranos") y un segundo ensayo con un reactivo de ensayo para detectar la totalidad de los anticuerpos IgM.

En todavía una realización adicional, el anticuerpo que debe detectarse es un anticuerpo IgG. En este caso, el reactivo de detección es un antígeno monomérico, por ejemplo una proteína de fusión monomérica tal como se ha indicado anteriormente. Además, el reactivo de ensayo comprende un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgM, que es un antígeno multimérico que comprende un complejo de polipéptidos de fusión tal como se ha indicado anteriormente, en el que cada polipéptido de fusión comprende un dominio de multimerización y una pluralidad de copias de un epítopo. El reactivo de eliminación de interferencias preferentemente no contiene un grupo informador.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM en una muestra, en el que la muestra puede comprender un anticuerpo interfiriente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interfiriente y/o un anticuerpo IgG interfiriente. Según dicho método, se utiliza un reactivo de ensayo que comprende un antígeno múltiple, es decir, un antígeno que comprende una pluralidad de copias de epítopo a la que puede unirse el anticuerpo que debe detectarse. Preferentemente, el antígeno de ensayo comprende un grupo informador.

El método de la invención se basa en la utilización de un antígeno de ensayo multimérico con una densidad y/o concentración efectiva de epítopos preseleccionada adaptada al tipo de anticuerpo IgM que debe detectarse. El antígeno de ensayo se combina con un reactivo de eliminación de interferencias adaptado para eliminar la unión de los tipos de anticuerpo IgM no deseados al antígeno de ensayo.

La densidad o concentración efectiva de epítopos del antígeno de ensayo se adapta para el tipo de anticuerpo IgM que debe detectarse, por ejemplo un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección,

preferentemente de una infección primaria o, alternativamente, un anticuerpo IgM presente en una etapa tardía de una infección, un anticuerpo IgM presente en una infección pasada y/o un anticuerpo IgM presente en una infección persistente o recurrente. La detección diferencial del anticuerpo IgM se lleva a cabo en presencia de por lo menos un reactivo de eliminación de interferencias, que puede comprender un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo IgM interfiriente y opcionalmente un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo IgG interfiriente.

El ensayo de la invención puede llevarse a cabo en un formato de ensayo de doble antígeno de tipo sándwich o en un formato indirecto tal como se ha indicado anteriormente. En un formato de doble antígeno de tipo sándwich, el receptor R^1 es un antígeno multimérico que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse. En un formato de ensayo indirecto, el receptor R^1 es un receptor que se une específicamente a cualquier IgM, particularmente a cualquier IgM humana en la muestra, por ejemplo a un anticuerpo anti-IgM humana. La unión del tipo de anticuerpo IgM deseado preferentemente se detecta en una fase sólida. Con este fin, el receptor R^1 preferentemente porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida, por ejemplo un grupo de acoplamiento tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente biotina. El grupo informador del receptor R^2 marcado es un grupo informador tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente un grupo electroquimioluminiscente. Al utilizar reactivos de eliminación de interferencias, es decir, los receptores R^3 y/o R^4, preferentemente se preincubaron con la muestra antes de añadir los receptores R^1 y/o R^2.

El receptor R^4 de eliminación de interferencias de IgG es un receptor monomérico, es decir, un antígeno que comprende una única copia de epítopo. El receptor de ensayo R^2 y el receptor R^3 de eliminación de interferencias de IgM son receptores multiméricos, es decir, antígenos que comprenden múltiples copias de epítopo. Sin embargo, R^2 y R^3 presentan diferentes densidades o concentraciones efectivas de epítopos y de esta manera se unen preferentemente a tipos diferentes de anticuerpos IgM. Para la determinación diferencial de los anticuerpos IgM presentes en una etapa temprana o aguda de una infección, preferentemente de una infección primaria, el receptor R^2 marcado puede comprender, por ejemplo, por lo menos 6, preferentemente por lo menos 8, y más preferentemente por lo menos 12 copias de epítopo, hasta 40, preferentemente hasta 30, y más preferentemente hasta 25 copias de epítopo reconocidas por el anticuerpo IgM que debe detectarse. El receptor R^3 de eliminación de interferencias, que es específico de los anticuerpos IgM "tardíos" presenta una densidad o concentración efectiva de epítopos que es por lo menos dos veces más baja, preferentemente por lo menos tres veces más baja, y más preferentemente por lo menos 4 veces más baja e incluso más baja, que la densidad o concentración de epítopos del receptor de ensayo R^2. En la presente realización, el receptor R^3 de eliminación de interferencias puede comprender 2 a 8, preferentemente 3 a 6, copias de epítopos.

El receptor de ensayo multimérico R^2 preferentemente es un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente. En particular, el receptor R^2 es un polipéptido de fusión que comprende: (i) por lo menos un dominio de multimerización, e (ii) una pluralidad de copias de un segmento epítopo procedente de un patógeno. El receptor R^3 de eliminación de interferencias multimérico también puede ser un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, debe indicarse que en la presente realización de la invención, también pueden utilizarse antígenos de ensayo multiméricos convencionales, por ejemplo antígenos multiméricos obtenidos mediante entrecruzamiento químico de antígenos o epítopos monoméricos por parte de entrecruzantes homobifuncionales o heterobifuncionales. Alternativamente, los antígenos multiméricos pueden ser moléculas portadoras, por ejemplo polipéptidos portadores con secuencias peptídicas de epítopo acopladas a los mismos o péptidos multiméricos, por ejemplo péptidos multiméricos ramificados tal como se describe en Lee *et al.*, Nature Biotechnology 23:1517-1526, 2005.

La presente invención se explica adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos, posteriormente.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Purificación de Skp-p52-X4 tal como se documenta mediante SDS-PAGE. Carril 1, estándar de proteínas Mark 12 no teñido de Invitrogen; carril 3, lisado crudo caotrópico de la cepa sobreproductora *E. coli* BL21/DE 3; carril 5, eluido de IMAC; carril 6, fracción de lavado con imidazol; carril 8, fracción de elución con imidazol; carril 9, Skp-p52-X4 tras la filtración en gel (Superdex 200). Skp-p52-X4 puede purificarse y plegarse nuevamente con altos rendimientos en el protocolo simple de una etapa descrito en los Métodos.

Figura 2A-I: Secuencias de aminoácidos (ver el Listado de secuencias).

Listado de secuencias

SEC ID nº 1:	secuencia de aminoácidos de SlyD (AA 1 a 165)
SEC ID nº 2:	secuencia de aminoácidos de FkpA (AA 26 a 270)
SEC ID nº 3:	secuencia de aminoácidos de Skp (AA 21 a 161)
SEC ID nº 4:	secuencia de aminoácidos de Skp-ppUL32-X1 (ppUL32= HCMV pp150, AA 587 a 640)
SEC ID nº 5:	secuencia de aminoácidos de Skp-ppUL32-X4
SEC ID nº 6:	secuencia de aminoácidos de Skp-pp150-X1 (pp150= HCMV pp150, AA 999 a 1.048)
SEC ID nº 7:	secuencia de aminoácidos de Skp-pp150-X4
SEC ID nº 8:	secuencia de aminoácidos de Skp-pp150-X1 (pp52= HCMV p52, AA 254 a 293)
SEC ID nº 9:	secuencia de aminoácidos de Skp-p52, AA 254 a 293

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de reactivos de ensayo de polipéptido de fusión

1 Materiales y métodos
1.1 Materiales y reactivos

Se obtuvo el Cl de guanidinio (GdmCl) de NIGU (Waldkraiburg, Alemania). Las tabletas de inhibidor de proteasa sin EDTA Complete®, imidazol y EDTA se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania); todos los demás compuestos químicos eran de grado analítico, de Merck (Darmstadt, Alemania). Las membranas de ultrafiltración (YM10, YM30) se obtuvieron de Amicon (Danvers, MA, USA); las membranas de microdiálisis (VS/0,025 µm) y las unidades de ultrafiltración (dispositivos de filtración Ultrafree Biomax) se obtuvieron de Millipore (Bedford, MA, USA). Las membranas de nitrato de celulosa y de acetato de celulosa (1,2 µm/0,45 µm/0,2 µm) para la filtración de los lisados crudos se obtuvieron de Sartorius (Göttingen, Alemania).

1.2 Clonación de casetes de expresión

Las secuencias de Skp, FkpA y SlyD se obtuvieron de la base de datos SwissProt (UniProt) (SkP: SwissProt nº de acceso P11457; FkpA: SwissProt nº de acceso P45523; SlyD: SwissProt nº de acceso POA9K9). Los genes de Skp, FkpA y SlyD de *E. coli* se amplificaron mediante PCR a partir de la cepa *E. coli* B21 (DE3), cortada y ligada en el vector de expresión pET24a (Novagen, Madison, Wisconsin, USA). Con el fin de evitar la formación de compuestos covalentes mediante puentes disulfuro, se eliminó la parte C-terminal rica en cisteínas de SlyD (166-196) y la versión truncada de SlyD AA 1 a 165 (SEC ID nº 1) se utilizó como pareja de fusión. Con el fin de garantizar la expresión citosólica de las moléculas diana, se omitieron las secuencias de señal de los chaperones periplásmicos FkpA y Skp. De esta manera, la versión AA 26 a 270 de FkpA (SEC ID nº 2) y la versión AA 21 a 161 de Skp (SEC ID nº 3) se utilizaron como módulos en los polipéptidos de fusión. Los casetes de expresión para las proteínas de fusión se diseñaron tal como se describe en Scholz *et al.* (J. Mol. Biol. 345:1229-1241, 2005). Se utilizaron técnicas de QuikChange (Stratagene, La Jolla, USA) y de PCR estándares para generar mutaciones puntuales, variantes por deleción e inserción o sitios de restricción. Todas las variantes de proteína recombinante contenían una etiqueta hexahistidina C-terminal para facilitar la purificación asistida por Ni-NTA y el replegamiento.

1.3 Expresión, purificación y replegamiento de variantes de proteína de fusión

Se purificaron todas las variantes de polipéptido de fusión mediante la utilización de protocolos virtualmente idénticos. Se cultivaron a 37ºC en medio LB más canamicina (30 µg/ml) células de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían el plásmido de expresión pET24a particular, hasta una DO_{600} de 1,5, y se indujo la sobreexpresión citosólica mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido 1 mM. Tres horas después de la inducción, las células se recolectaron mediante centrifugación (20 minutos a 5.000 g), se congelaron y se almacenaron a -20ºC. Para la lisis celular, el pellet congelado se resuspendió en fosfato sódico 50 mM refrigerado, pH 8,0, GdmCl 7,0 M e imidazol 5 mM, y la suspensión se agitó durante 2 horas sobre hielo para completar la lisis celular. Tras la centrifugación y filtración (membrana de nitrato de celulosa, 0,45 µm/0,2 µm), el lisado se aplicó sobre una columna de Ni -NTA equilibrada con el tampón de lisis que incluía TCEP 5,0 mM (tris(2-carboxietil)fosfina). La etapa de lavado posterior se adaptó para la proteína diana respectiva y se realizó con imidazol 10-25 mM (proteínas de fusión SlyD y FkpA) a imidazol 30 mM (proteínas de fusión Skp) en fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, GdmCl 7,0 M y TCEP 5,0 mM.Se aplicaron por lo menos 10 a 15 volúmenes del tampón de lavado. A continuación, se sustituyó la solución de GdmCl por fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, TCEP 5,0 mM, para inducir el replegamiento conformacional de la proteína unida a matriz. Con el fin de evitar la reactivación de las proteasas copurificadas, se incluyó un cóctel de inhibidor de proteasa (sin EDTA, Complete®, Roche) en el tampón de replegamiento. Se aplicó un total de 15 a 20 volúmenes de columna de tampón de replegamiento en una reacción durante la noche. A continuación, se eliminó tanto TCEP como el cóctel de inhibidor sin EDTA Complete® mediante lavado con 3 a 5

volúmenes de columna de fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, NaCl 100 mM e imidazol 40 mM. A continuación, se eluyó la proteína nativa con imidazol 250 mM en el mismo tampón. Se evaluaron las fracciones que contenían proteínas para su pureza mediante SDS-PAGE-tricina tal como describen Schägger y von Jagow (Anal. Biochem. 166:368-379, 1987) y se agruparon. Finalmente, las proteínas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia) y se agruparon y se concentraron las fracciones que contenían proteínas en una celda Amicon (YM10).

Se produjeron los polipéptidos de fusión Skp siguientes:

Skp-ppUL32-X1 (SEC ID nº 4) y Skp-ppUL32-X4 (SEC ID nº 5). Estos polipéptidos de fusión comprenden el módulo de fusión de Skp y una (X1) o cuatro (X4) copias del epítopo ppUL32 del citomegalovirus humano. Este epítopo corresponde a los aminoácidos 587 a 640 de la fosfoproteína estructural grande pp150 de HCMV (Uniprot ID P08318).

Skp-pp150-X1 (SEC ID nº 6) y Skp-pp 150-X4 (SEC ID nº 7). Estos polipéptidos de fusión comprenden el módulo de fusión de skp y una (X1) o cuatro (X4) copias del epítopo pp150 de HMCV, que corresponde a los aminoácidos 999 a 1.048 de pp150 del HCMV.

Skp-p52-X1 (SEC ID nº 8) y Skp-p52-X4 (SEC ID nº 9). Estos polipéptidos de fusión comprenden el módulo de fusión de Skp y una (X1) o cuatro (X4) copias del epítopo p52 de HMCV correspondiente a los aminoácidos 254 a 923 de la proteína accesoria p52 de polimerasa del HCMV (Uniprot ID nº P16790)

1.4 Mediciones espectroscópicas

Se llevaron a cabo mediciones de la concentración de proteínas con un espectrofotómetro de doble haz Uvikon XL. Se determinaron los coeficientes de extinción molar (ε_{280}) mediante la utilización del procedimiento descrito por Pace *et al.* (Protein Sci. 4 (1995), 2411-2423).

1.5 Acoplamiento de fracciones de rutenio a las proteínas de fusión

Se modificaron los grupos ε-amino de lisina de las proteínas de fusión a concentraciones de proteína de ~10 mg/ml con marcajes de rutenio activados con N-hidroxisuccinimida. La proporción molar de marcaje:proteína variaba entre 2:1 y 7:1, dependiendo de la proteína de fusión respectiva. El tampón de reacción era fosfato potásico 150 mM (pH 8,0), cloruro potásico 50 mM y EDTA 1 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos y se detuvo mediante la adición de L-lisina tamponada a una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolítica de los marcajes, se prepararon las soluciones madre respectivas en DMSO seco (calidad Seccosolv, Merck, Alemania). Las concentraciones de DMSO de hasta 20% en el tampón de reacción resultan bien toleradas por todas las proteínas de fusión estudiadas. Tras la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcaje libre no reaccionado y el solvente orgánico mediante pase del conjugado de proteína cruda por una columna de filtración en gel (Superdex 200 HiLoad).

1.6 Reactividad inmunológica de proteínas de fusión chaperones

Los módulos de fusión chaperones se utilizaron para detectar los anticuerpos IgM dirigidos contra los antígenos p52 y pp150 de HMCV, que se encuentran presentes en abundancia en suero humano al inicio de la infección por CMV. Se retó la reactividad inmunológica en un analizador automático Elecsys® 2010 utilizando el formato de captura µ (es decir, la colección completa de IgM se captura y se inmoviliza en la fase sólida mediante una IgG anti-IgM específica).

La detección de señal en el inmunoensayo Elecsys® se basa en la electroquimioluminiscencia. Se inmovilizó el anticuerpo de captura de IgM conjugado con biotina sobre la superficie de perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, mientras que el antígeno de señalización portaba un catión rutenio acomplejado como la fracción luminiscente. En presencia de anticuerpos IgM anti-p52/anti-pp150, se establecieron puentes entre el complejo cromogénico de rutenio y la fase sólida, emitiendo luz a 620 nm tras la excitación en un electrodo de platino. Los resultados de señal se proporcionan en unidades de luz arbitrarias. Para su utilización como antígenos Elecsys®, las proteínas de fusión p52/pp150 solubles a estudio se concentraron y se modificaron con grupos de rutenio activados con N-hidroxi-succinimida tal como describen Scholz *et al. supra*, 2005. La concentración de las variantes de fusión chaperones en las mediciones del inmunoensayo fueron de ~20 a 100 ng/ml. Se utilizaron por lo menos cinco sueros negativos a modo de controles. Con el fin de minimizar los resultados falsos positivos, se añadieron módulos chaperones no marcados químicamente polimerizados a las muestras a modo de sustancia anti-interferencia.

2 Resultados

2.1 Rendimiento de expresión elevado

Skp, FkpA, SlyD y las variantes de fusión de los mismos se sobreexpresaban en abundancia en las cepas BL21

(DE3) de *E. coli*. Debido a la elevada tasa de síntesis, las proteínas diana se acumulaban parcialmente en forma de cuerpos de inclusión en el citosol de *E. coli*. El replegamiento acoplado a la matriz resultó ser el método de elección para renaturalizar Skp, FkpA, SlyD y las variantes de fusión de los mismos a rendimientos muy elevados. Esencialmente, el protocolo de renaturalización siguió el método desarrollado para las proteínas de fusión SlyD (Scholz *et al. supra*, 2005; Scholz *et al.*, Biochemistry 45:20-33, 2006). Tras el protocolo de purificación acoplada y replegamiento, pudieron obtenerse más de 20 mg de proteína diana a partir de 1 g de células de *E. coli* húmedas. A título de ejemplo, en la figura 1 se muestra la purificación de Skp-p52-X4 tal como se documenta mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 2: Ensayo de IgM contra CMV

Se desarrolló un ensayo para determinar los anticuerpos IgM dirigidos contra CMV. Este ensayo permite diferenciar entre un estadio agudo/temprano de infección primaria y un estadio tardío de infección o una infección recurrente. El reactivo de detección comprende complejos, comprendiendo cada uno tres unidades de un polipéptido de fusión, comprendiendo cada uno el dominio de trimerización Skp y 4 epítopos de CMV (UL32 ó 150) marcados con $(bipiridina)_3$ de rutenio (BPRu). De esta manera, una molécula multimérica del reactivo de detección comprende 12 copias de epítopo. El ensayo se llevó a cabo en ausencia o en presencia de reactivos de eliminación de interferencias, es decir, con reactivo de eliminación de interferencias de IgG monomérica SlyD-X, en el que X es el epítopo UL32 ó 150, con reactivos de eliminación de interferencias de IgM dimérica o tetramérica $(FkpA\text{-}X)_2$ y $(FkpA\text{-}X2)_2$, en los que FkpA es un dominio de dimerización y X es el epítopo UL32 ó pp150, y con reactivos de eliminación de interferencias de IgM trimérica o hexamérica $(Skp\text{-}X)_3$ y $(Skp\text{-}X2)_3$, en los que Skp es un dominio de trimerización y X, el epítopo UL32 ó pp150.

1 Materiales y métodos

1.1 Componentes

Tampón B1
Variante 1:
Tampón MES 50 mM, pH 6,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM, metilisotiazolona y oxipiriona al 0,1%; prolidocanol y albúmina de suero bovino al 0,2% (BSA) y 1 mg/l de Mab monoclonal humano-anti-IgM humana.

Variante 2:
Al igual que la variante 1 más 2 mg/l de SlyD-pp(UL32)x1 y 2 mg/ml de SlyD-pp(150)x1

Variante 3:
Al igual que la variante 1 más 2 mg/l de FkpA-pp(UL32)x1 y 2 mg/ml de FkpA-pp(150)x1

Variante 4:
Al igual que la variante 1 más 2 mg/l de Skp-pp(UL32)x1 y 2 mg/ml de Skp-pp(150)x1. Tampón B2 Tampón MES 50 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, metilisotiazolona y oxipiriona al 0,1%, prolidocanol y albúmina de suero bovino al 0,2% (BSA).Componentes inmunológicos en B2: antígenos de CMV rutenilados. 40 ng/ml de Skp-(pp150)x4-BPRu y 40 ng/ml de Skp-(UL32)x4-BPRu

2. Procedimiento de ensayo en el instrumento Elecsys 2010

10 µl de muestras de suero diluido (1:20 con diluyente universal EleCsys) + 75 µl de tampón B1. Tras un tiempo de incubación de 9 minutos, se añadieron 75µl de tampón B2 y 40µl de perlas recubiertas con estreptavidina. Tras 9 minutos, la mezcla se transportó a la celda de medición y se midió la señal de ECL.

3. Resultados

Se muestran los resultados del ensayo en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

Estado de la infección	Variante 1 sin inhibición	Variante 2 con inhibición de SlyD-X (monómero)		Variante 3 con inhibición de FkpA-X (dímero y tetrámero)		Variante 4 con inhibición de Skp-X (trímero y hexámero)		Ensayo de avidez RADIM:
	pulsos	pulsos	% (respecto a var.1)	pulsos	% (respecto a var. 1)	pulsos	% (respecto a var. 1)	% de avidez
no infectado	724	759	104,8%	750	103,6%	757	104,6%	
no infectado	663	650	98,0%	663	100,0%	660	99,5%	
no infectado	607	604	99,5%	601	99,0%	617	101,6%	
no infectado	632	641	101,4%	629	99,5%	649	102,7%	
no infectado	795	804	101,1%	787	99,0%	777	97,7%	
agudo	4.494	4.401	97,9%	4.365	97,1%	3.653	81,3%	12%
agudo	6.713	6.439	95,9%	6.165	91,8%	5.482	81,7%	14%
agudo	12.713	11.905	93,6%	11.438	90,0%	10.081	79,3%	22%
agudo	25.583	24.779	96,9%	23.140	90,5%	20.089	78,5%	22%
agudo	101.418	105.922	104,4%	103.361	101,9%	92.796	91,5%	11%
agudo	10.651	10.442	98,0%	10.060	94,5%	8.480	79,6%	9%
agudo	16.468	16.148	98,1%	15.054	91,4%	11.905	72,3%	
agudo	104.219	110.150	105,7%	110.754	106,3%	107.816	103,5%	
agudo	219.105	215.878	98,5%	202.350	92,4%	171.314	78.2%	
infección pasada	3.610	3.255	90,2%	1.545	42,8%	1280	35,5%	87%
infección pasada	10.995	7.779	70,8%	3.717	33,8%	3183	28,9%	92%
reactivación	12.388	10.145	81,9%	4.173	33,7%	2651	21,4%	
reactivación	6.542	5.579	85,3%	2.493	38.1%	1791	27,4%	
reactivación	8.649	8.025	92.8%	3.116	36,0%	1892	21,9%	
reactivación	9.959	9.548	95,9%	5.761	57,8%	4976	50,0%	

Tabla 2

Estado de la infección	Variante 1 sin inhibición	Variante 2 con inhibición de SlyD-X (monómero)		Variante 3 con inhibición de FkpA-X (dímero y tetrámero)		Variante 4 con inhibición de Skp-X (trímero y hexámero)		Ensayo de avidez RADIM:
	pulsos	pulsos	% (respecto a var.1)	pulsos	% (respecto a var. 1)	pulsos	% (respecto a var. 1)	% de avidez
no infectado	724	759	104,8%	750	103,6%	757	104,6%	
no infectado	663	650	98,0%	663	100,0%	660	99,5%	
no infectado	632	641	101,4%	629	99,5%	649	102,7%	
no infectado	795	804	101,1%	787	99,0%	777	97,7%	
agudo	18.892	19.145	100,9%	18.905	99,6%	16.878	88,9%	18%
agudo	31.865	31.861	100,0%	29.462	92,5%	24.688	77,5%	18%
agudo	32.918	32.801	99,6%	30.490	92,6%	25.012	76,0%	11%
agudo	41.662	41.577	99,8%	39.666	95,2%	34.284	82,3%	11%
agudo	25.223	25.171	99,8%	23.405	92,8%	19.732	78,2%	13%

agudo	52.253	52.175	99,9%	48.414	92,7%	40.789	78,1%	15%
agudo	20.874	20.687	99,1%	19.276	92,3%	16.271	77,9%	7%
agudo	16.587	15.791	95,2%	16.218	97,8%	14.982	90,3%	11%
agudo	47.801	48.075	100,6%	45.351	94,9%	41.383	86,6%	18%
infección pasada	8.432	8.736	103,6%	4.966	58,9%	2.967	35,2%	83%
infección pasada	14.439	11.351	78,6%	2.508	17,4%	1.910	13,2%	61%
infección pasada	4.693	3.212	68,4%	976	20,8%	722	15,4%	93%
infección pasada	4.803	4.468	93,0%	1.710	35,6%	1.112	23,2%	57%
infección pasada	6.058	5.855	96,6%	3.789	62,5%	2.582	42,6%	71%
infección pasada	28.152	27.962	99,3%	18.064	64,2%	12.521	44,5%	79%

4 Análisis de los resultados

Se sometieron sueros de individuos no infectados, de pacientes que sufrían una infección aguda y de pacientes que habían experimentado una infección en el ensayo, a un ensayo inmunológico basado en el formato de captura tal como se encuentra descrito. Se resumen los resultados en la Tabla 1. La primera columna (variante 1) ilustra las señales obtenidas en ausencia de ningún reactivo de eliminación de interferencias o módulo de inhibición. Los pulsos con los sueros humanos CMV-negativos eran de aproximadamente 700, y se observó una clara diferencia entre los sueros negativos y positivos. La segunda columna (variante 2) muestra las señales obtenidas en presencia del módulo de inhibición monomérico SlyD-X. Tal como se pone de manifiesto en la intensidad de la señal residual (en %), el efecto de inhibición de SlyDX era negligible tanto en sueros de infecciones agudas como en sueros de infecciones pasadas. Lo anterior se encuentra en línea con lo esperado, debido a que SlyDX, en forma de monómero, no debería ser capaz de interactuar eficientemente con las moléculas polivalentes de IgM.

La tercera columna (variante 3) muestra las señales obtenidas en presencia del módulo de inhibición dimérico FkpA-X. La intensidad de la señal residual pone de manifiesto un efecto de inhibición negligible de FkpA-X en sueros agudos y un efecto de inhibición significativo de FkpA-X en sueros de una infección pasada. Este resultado refleja la densidad más alta de epítopos (X) de FkpA-X con respecto a SlyD-X. Evidentemente, FkpA-X interactúa significativamente con las moléculas maduras de IgM de infecciones pasadas por CMV, pero interactúa bastante débilmente con moléculas de IgM temprana inmaduras de infecciones agudas por CMV.

En la penúltima columna (variante 4), se subrayan los efectos de inhibición del reactivo trimérico de eliminación de interferencias Skp-X. Se observa cierta inhibición de la señal en sueros agudos, pero una inhibición de la señal mucho más alta en los sueros con infección pasada. Lo anterior resulta indicativo de una interacción del módulo de inhibición Skp-X con moléculas de IgM tanto tempranas como tardías. Debido a que la interacción de Skp-X con moléculas de IgM tardías es mucho más fuerte en comparación con la interacción con moléculas de IgM tempranas, resulta posible una detección diferencial de los anticuerpos IgM tempranos indicativa de una infección aguda.

En resumen, SlyD-X, FkpA-X y Skp-X interactúan con moléculas de IgM dirigidas contra el epítopo X, inhibiendo de esta manera el ensayo de captura μ de señal, en el que se utiliza Skp-X4 como el antígeno de señalización. La eficiencia relativa de inhibición se incrementa en el orden SlyD-X<FkpA-X<Skp-X, correspondiente a la densidad efectiva de epítopos. La eficiencia de inhibición es elevada con moléculas de IgM madura (de infecciones pasadas), y es bastante baja con moléculas de IgM inmadura (de infecciones agudas).

Los resultados de los presentes inventores permiten discriminar claramente entre las infecciones tempranas y tardías, por ejemplo las infecciones víricas. Mediante la utilización de un reactivo de detección marcado con una densidad elevada de epítopos tales como un módulo de detección Skp-X4 (12 copias de epítopo) y módulos de inhibición no marcados con una densidad de epítopos más baja del tipo SlyD-X (1 copia de epítopo), FkpA-X (2 copias de epítopo) o Skp-X (3 copias de epítopo), puede llevarse a cabo una discriminación entre infecciones tempranas y tardías, lo que resulta clínicamente importante. Hasta hoy, dicha discriminación no ha resulta posible entre diferentes fracciones de IgM pero se ha intentado mediante la realización de ensayos de avidez de IgG: en breve, se detecta IgG en ausencia y en presencia de concentraciones no desnaturalizantes de un agente caotrópico tal como, por ejemplo, urea o cloruro de guanidinio. El caótropo preferentemente reduce la unión de moléculas de IgG inmaduras ("tempranas"), pero sólo afecta ligeramente a las propiedades de unión de las moléculas maduras de alta afinidad ("tardías") de IgG. La proporción entre la altura de la señal en presencia y en ausencia de caótropo

rinde la fracción de moléculas de IgG de alta afinidad (resistentes a caótropos). Un elevado porcentaje en un ensayo de avidez refleja una fracción predominante de moléculas de IgG de elevada afinidad, y un porcentaje bajo refleja una fracción predominante de moléculas de IgG de baja afinidad (tempranas). De esta manera, los porcentajes elevados en un ensayo de avidez son indicativos de una infección tardía, mientras que los porcentajes bajos son indicativos de una infección temprana.

La última columna en las Tablas 1 y 2 resume los resultados de los sueros de infecciones agudas y pasadas, que se sometieron a un ensayo comercial de avidez de IgG (RADIM). Resulta evidente que los sueros agudos muestran señales residuales bajas (<20%), mientras que los sueros de infecciones pasadas muestran señales residuales altas (>60%). Estos resultados concuerdan muy bien con el enfoque de inhibición de la invención. Lo anterior resulta notable debido a que el enfoque inventivo se centra en la detección diferencial de moléculas de IgM, mientras que los ensayos de avidez en general se centran en la detección diferencial de las moléculas de IgG. La información obtenida mediante los diferentes enfoques es complementaria: las inmunoglobulinas inmaduras (concomitantes con respuestas inmunológicas tempranas) conducen a una elevada inhibición en un ensayo de avidez de IgG (última columna), pero a una inhibición bastante baja en el ensayo de inhibición Skp-X de la invención (penúltima columna).

Las inmunoglobulinas maduras (concomitantes con infecciones pasadas o recurrentes) conducen a un grado bajo de inhibición en un ensayo de avidez de IgG (última columna), aunque a un grado de inhibición bastante elevado en el ensayo de inhibición Skp-X de la invención. Las inmunoglobulinas inmaduras (concomitantes con las infecciones agudas o tempranas) conducen a un grado elevado de inhibición en un ensayo de avidez de IgG, aunque a un grado bajo de inhibición en el ensayo de inhibición Skp-X según la invención. De esta manera, el enfoque inventivo a la detección diferencial de moléculas de IgM añade información valiosa al campo diagnóstico, en todos los casos en que resulte importante diferenciar entre estadios tempranos y posteriores de una infección y detectar estadios tempranos de una infección.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann - La Roche AG

<120> Detección de infecciones primarias por patógenos

<130> 39814P EP

<140> EP07008124
<141> 2007-04-20

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 165
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SlyD

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(165)
<223> SlyD (1-165)

<400> 1

```
Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
1               5                  10                  15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
            20                  25                  30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
        35                  40                  45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
    50                  55                  60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
65                  70                  75                  80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
                85                  90                  95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
            100                 105                 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
        115                 120                 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
    130                 135                 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
145                 150                 155                 160

Asp His Asp His Asp
                165
```

<210> 2
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FkpA

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(245)
<223> FkpA (26-270)

<400> 2

```
Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe
1               5                  10                  15

Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly
            20                  25                  30

Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys
        35                  40                  45

Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe
65                  70                  75                  80

Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala
                85                  90                  95

Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys
            100                 105                 110

Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val
        115                 120                 125

Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val
    130                 135                 140

Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr
145                 150                 155                 160

Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly
                165                 170                 175

Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu
            180                 185                 190

Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile
        195                 200                 205

Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala
225                 230                 235                 240

Asp Ser Ala Lys Lys
                245
```

<210> 3

<211> 141

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Skp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(141)
<223> Skp (21-161)

<400> 3

```
Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln Val
1               5                  10                  15

Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Lys Gly
            20                  25                  30

Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys Met
        35                  40                  45

Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu Glu
    50                  55                  60

Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln Ala
65                  70                  75                  80

Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys Leu
                85                  90                  95

Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln Asp
            100                 105                 110

Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser Asp
        115                 120                 125

Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys
    130                 135                 140
```

<210> 4
<211> 230
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Skp-ppUL32-X1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(230)
<223> Skp-ppUL32-X1 (ppUL32=pp150, 587-640)

<400> 4

```
Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1               5                  10                  15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
        35                  40                  45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
    50                  55                  60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65                  70                  75                  80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
            100                 105                 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
        115                 120                 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr
                165                 170                 175

Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe
            180                 185                 190

Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr
        195                 200                 205

Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Leu Glu
    210                 215                 220

His His His His His His
225                 230
```

<210> 5

<211> 400
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Skp-ppUL32-X4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(400)
<223> Skp-ppUL32-X4 (ppUL32=pp150, 587-640)

<400> 5

```
Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1               5                  10                  15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
        35                  40                  45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
    50                  55                  60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65                  70                  75                  80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
            100                 105                 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
        115                 120                 125
```

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr
165 170 175

Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe
180 185 190

Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr
195 200 205

Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Ala Gly
210 215 220

Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala
225 230 235 240

Pro Ala Pro Ala Pro Pro Thr Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn
245 250 255

Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn
260 265 270

Pro Ala Asn Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro
275 280 285

Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr
290 295 300

Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro
305 310 315 320

Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Ala
325 330 335

Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr
340 345 350

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro
355 360 365

Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp
370 375 380

Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Leu Glu His His His His His His
385 390 395 400

<210> 6
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Skp-pp150-X1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(226)
<223> Skp-pp150-X1 (pp150 999-1048)

<400> 6

```
Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1               5                  10                  15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
        35                  40                  45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
    50                  55                  60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65                  70                  75                  80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
            100                 105                 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
        115                 120                 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro
                165                 170                 175

Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly
            180                 185                 190

 Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu
        195                 200                 205

 Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Leu Glu His His His His
    210                 215                 220

 His His
225
```

<210> 7
<211> 386
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Skp-pp150-X4

<220>
<221> MISC_FEATURE 10
<222> (1)..(386)
<223> Skp-pp150-X4 (pp150 999-1.048)

<400> 7

```
Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1               5                  10                  15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
        35                  40                  45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
    50                  55                  60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65                  70                  75                  80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
            100                 105                 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
        115                 120                 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
    130                 135                 140
```

```
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro
                165                 170                 175

Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly
            180                 185                 190

Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu
        195                 200                 205

Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe
    210                 215                 220

Asp Leu Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser
225                 230                 235                 240

Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile
                245                 250                 255

Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Met
            260                 265                 270

Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly
        275                 280                 285

Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp
    290                 295                 300

Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu
305                 310                 315                 320

Glu Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro Gln
                325                 330                 335

Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly Ala
            340                 345                 350

Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys
        355                 360                 365

Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Leu Glu His His His His His
    370                 375                 380

His His
385
```

<210> 8
<211> 216
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Skp-p52-X1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(216)
<223> Skp-p52-X1 (p52 254-293)

<400> 8

```
Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1               5                  10                  15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
        35                  40                  45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
    50                  55                  60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65                  70                  75                  80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
            100                 105                 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
        115                 120                 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Gly Gly Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu
                165                 170                 175

Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys
            180                 185                 190

Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Leu Glu His His His His His His
    210                 215
```

<210> 9
<211> 345
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Skp-p52-X4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(345)
<223> Skp-p52-X4 (p52 254-293)

<400> 9

```
Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1               5                  10                  15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
        35                  40                  45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
    50                  55                  60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65                  70                  75                  80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
            100                 105                 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
        115                 120                 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu Asn Phe Leu Thr Glu
    210                 215                 220

Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn Tyr Val Gly Asn
225                 230                 235                 240

Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Ala Ser Arg Asn
                245                 250                 255

Gly Leu Phe Ala Val Glu Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg
            260                 265                 270

Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val
    290                 295                 300

Glu Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp
305                 310                 315                 320

Lys Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly
                325                 330                 335

Gly Leu Glu His His His His His His
            340                 345
```

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en el que la muestra puede comprender un anticuerpo interfiriente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interfiriente y/o un anticuerpo IgG interfiriente, comprendiendo las etapas siguientes:

(a) incubar dicha muestra con un reactivo de ensayo, que comprende:

(i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a los anticuerpos IgM,

(ii) por lo menos un receptor R^2, que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, en el que: R^2 es un antígeno multimérico y porta un grupo informador,

(iii) por lo menos un receptor R^3, que se une específicamente al anticuerpo IgM interfiriente, en el que R^3 es un antígeno multimérico con una densidad o concentración efectiva de epítopos que es por lo menos dos veces inferior a la densidad o concentración de epítopos del receptor R^2, y

(b) que permite que se formen los complejos siguientes:

(i) un complejo que comprende R^1, dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente y R^2, portando dicho complejo un grupo informador,

(ii) opcionalmente un complejo que comprende R^3 y dicho anticuerpo IgM interfiriente, eliminando de esta manera la unión interfiriente de dicho anticuerpo IgM interfiriente a R^2, y

(c) determinar dicho grupo informador unido mediante R^2 a dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, a modo de medida de dicho anticuerpo IgM en dicha muestra.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el reactivo de ensayo comprende además:

(iv) un receptor R^4 que se une específicamente a un anticuerpo IgG, en el que R^4 es un antígeno monomérico que comprende una única copia de epítopo, y en el que opcionalmente un complejo que comprende R^4 y se permite que se forme dicho anticuerpo IgG interfiriente, eliminando de esta manera la unión interfiriente de dicho anticuerpo IgG interfiriente a R^2.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo IgM que debe detectarse es un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección y en el que el anticuerpo IgM interfiriente es un anticuerpo IgM presente en una etapa tardía de una infección presente o pasada y/o un anticuerpo IgM presente en una infección persistente o recurrente.

4. Método según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo IgM que debe detectarse es un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección primaria.

5. Método según la reivindicación 3 ó 4, en el que el receptor R2 comprende por lo menos 6 copias de epítopo reconocidos por el anticuerpo IgM que debe detectarse.

6. Método según la reivindicación 5, en el que el receptor R2 comprende por lo menos 8 copias de epítopo reconocidas por el anticuerpo que debe detectarse.

7. Método según la reivindicación 5, en el que el receptor R2 comprende por lo menos 12 copias de epítopo reconocidas por el anticuerpo IgM que debe detectarse.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el receptor R1 es un antígeno multimérico o un anticuerpo anti-IgM humana.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el receptor R1 porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el receptor R3 y el receptor R4, en caso de hallarse presente, se preincuban con la muestra antes de añadir los receptores R1 y/o R2.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el receptor R2 es un polipéptido de fusión que comprende:

(i) por lo menos un dominio de multimerización, y

(ii) una pluralidad de copias de un segmento epítopo procedente de un patógeno.

12. Reactivo de ensayo para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en el que: la muestra puede comprender un anticuerpo interfiriente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interfiriente y/o un anticuerpo IgG interfiriente, comprendiendo:

(i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a los anticuerpos IgM,

(ii) por lo menos un receptor R^2, que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse

diferencialmente, en el que: R^2 es un antígeno multimérico y porta un grupo informador,
(iii) por lo menos un receptor R^3, que se une específicamente al anticuerpo IgM interfiriente, en el que R^3 es un antígeno multimérico con una densidad o concentración efectiva de epítopos que es por lo menos dos veces inferior a la densidad o concentración de epítopos del receptor R^2.

13. Reactivo de ensayo según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente: (iv) un receptor R4 que se une específicamente a un anticuerpo IgG, en el que R4 es un antígeno monomérico que comprende una única copia de epítopo.

14. Reactivo de ensayo según la reivindicación 12 ó 13, en el que el receptor R1 es un antígeno multimérico o un anticuerpo anti-IgM humana.

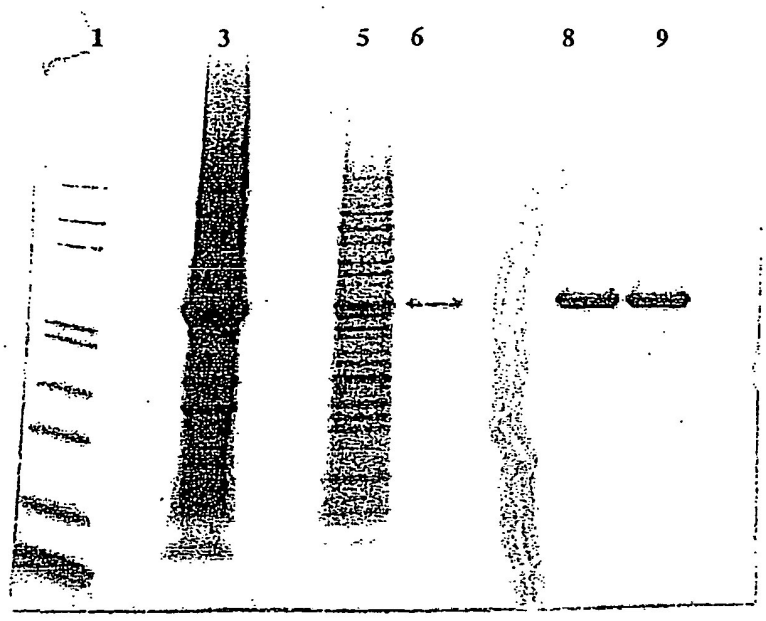

Figura 1

Figura 2A SlyD (1-165)

```
  1 MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV   60
 61 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD  120
121 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHD
```

Figura 2B: FkpA (26-270)

```
  1                            AEAAK PATAADSKAA FKNDDQKSAY ALGASLGRYM   60
 61 ENSLKEQEKL GIKLDKDQLI AGVQDAFADK SKLSDQEIEQ TLQAFEARVK SSAQAKMEKD  120
121 AADNEAKGKE YREKFAKEKG VKTSSTGLVY QVVEAGKGEA PKDSDTVVVN YKGTLIDGKE  180
181 FDNSYTRGEP LSFRLDGVIP GWTEGLKNIK KGGKIKLVIP PELAYGKAGV PGIPPNSTLV  240
241 FDVELLDVKP APKADAKPEA DAKAADSAKK
```

Figura 2C: Skp (21-161)

```
  1                       ADKIAIVNMG SLFQQVAQKT GVSNTLENEF KGRASELQRM   60
 61 ETDLQAKMKK LQSMKAGSDR TKLEKDVMAQ RQTFAQKAQA FEQDRARRSN EERGKLVTRI  120
121 QTAVKSVANS QDIDLVVDAN AVAYNSSDVK DITADVLKQV K
```

Figura 2D: Skp-ppUL32-X1 (ppUL32=pp150, 587-640)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGAG
AGAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPL
PGDMNPANGGGLEHHHHHH

Figura 2E: Skp-ppUL32-X4 (ppUL32=pp150, 587-640)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGAG
AGAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPL
PGDMNPANGGGAGAGAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQT
PVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANGGGAGAGAAILTPTPVNPSTA
PAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANGGGAGA
GAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLP
GDMNPANGGGLEHHHHHH

Figura 2F: Skp-pp150-X1 (pp150 999-1048)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGMK
TVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAGMGGAKTPSDAVQNILQKIEKI
KNTEEGGGLEHHHHHH

Figura 2G: Skp-pp150-X4 (pp150 999-1048)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGMK
TVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAGMGGAKTPSDAVQNILQKIEKI
KNTEEGGGMKTVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAGMGGAKTPSDA
VQNILQKIEKIKNTEEGGGMKTVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAG
MGGAKTPSDAVQNILQKIEKIKNTEEGGGMKTVAFDLSSPQKS
GTGPQPGSAGMGGAKTPSDAVQNILQKIEKIKNTEEGGGLEHH
HHHH

Figura 2H: Skp-pp52-X1 (pp52 254-293)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGVA
SRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGGGLE
HHHHHH

Figura 2I: Skp-pp52-X4 (pp52 254-293)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGVA
SRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGGGV
ASRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGGG
VASRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGG
GVASRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGG
GGLEHHHHHH