

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 654**

21 Número de solicitud: 201330278

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.08.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.07.2013

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 201031230 05.08.2010

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2011/070573

71 Solicitantes:

**CERTEST BIOTEC, S.L. (100.0%)
Pol. Ind. Río Gállego II Calle J nº 1
50840 SAN MATEO DE GALLEGO (ZARAGOZA)
ES**

72 Inventor/es:

**VELASCO MICHELENA, Beatriz;
LANDETA ELORZ, Oscar y
GENZOR ASÍN, Carlos Gustavo**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **DISPOSITIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS A**

57 Resumen:

Dispositivo para el diagnóstico de la Hepatitis A.
La presente invención pertenece al campo del diagnóstico de enfermedades causadas por virus. En concreto, se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico para el diagnóstico de la Hepatitis A mediante la detección del virus de la Hepatitis A o sus fragmentos en muestras de heces.

ES 2 412 654 A1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para el diagnóstico de la Hepatitis A

Campo de la invención

5 La presente invención se encuadra dentro del área de la biotecnología y en concreto en el diagnóstico de enfermedades causadas por virus. El objeto de la invención es un dispositivo sencillo de detección del virus de la Hepatitis A o sus fragmentos en muestras de heces.

Antecedentes de la invención

10 La Hepatitis A es un enfermedad del hígado causada por el Virus de la Hepatitis A (HAV). Como otras hepatitis (B,C,D,E) un síntoma muy característico es la ictericia. Las infecciones por Hepatitis A son mucho más frecuentes en países muy poblados con bajos niveles higiénico-sanitarios. Afecta principalmente a niños de menos de 5 años de países en vías de desarrollo donde la seroprevalencia puede llegar al 100%.

15 El virus de la hepatitis A es transmitido entre las personas por la ruta oral-fecal. El virus se excreta abundantemente en las heces de las personas infectadas y es estable en el medioambiente durante largos períodos de tiempo. La adquisición típica es por ingestión de comida o agua contaminada con heces (Lemon SM. *Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. Clinical Chemistry*, 1997, 43(8(B)):1494-1499).

El transcurso de la enfermedad es muy variable. Hay pacientes, especialmente niños, que no desarrollan síntomas, ni siquiera ictericia. La intensidad de los síntomas entre los pacientes que los manifiestan es también variable. El transcurso de la Hepatitis A (aguda) se puede dividir en 4 fases (Hepatitis A (WHO/CDS/CSR/EDC/2000.7) World Health Organization, 2000):

20 - Incubación: Aproximadamente 30 días. No hay síntomas, pero si replicación activa del virus y gran transmisibilidad de la enfermedad.

- Preictericia: 4-10 días. Aparecen síntomas como: pérdida de apetito, fatiga, dolor abdominal, nauseas, vómitos, fiebre, diarrea, orina oscura y heces pálidas.

25 - Ictericia: Se presentan los síntomas de ictericia característicos de las hepatitis. Suelen remitir el resto de los síntomas. Desaparece la viremia pero las heces son infectivas una o dos semanas más desde la aparición de la de la ictericia.

- Convalecencia: El periodo de recuperación de la enfermedad es de duración variable 3-6 meses.

30 La expulsión de virus en las heces al igual que la viremia tiene lugar durante las fases de incubación y preictericia y cesa al alcanzar la fase de ictericia. Es precisamente entonces cuando empiezan a aparecer los anticuerpos en la sangre, primero los del tipo IgM y luego IgA e IgG (Stapleton JT and Lemon SM, *Hepatitis A and Hepatitis E*. In *Infectious Diseases 5th ed.* Philadelphia, Lippincott Co, 1994; 790-797).

35 Actualmente el diagnóstico se realiza detectando la presencia de anticuerpos anti-HAV en el suero sanguíneo. De esta forma se distingue la hepatitis A de otras hepatitis. Más concretamente, el diagnóstico se basa en la identificación de anticuerpos tipo IgM anti-HAV en el suero de los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad. Estos anticuerpos persisten en el suero entre 3 y 6 meses. Anticuerpos del tipo IgG anti-HAV también están presentes durante el transcurso de la enfermedad y persisten durante décadas después de una infección aguda (Hepatitis A (WHO/CDS/CSR/EDC/2000.7) World Health Organization, 2000).

También se puede diagnosticar la enfermedad identificando dichos anticuerpos anti-HAV en muestras de saliva (WO 97/02490).

40 El diagnóstico de la enfermedad en base a la medida de los anticuerpos anti-HAV en el suero (o saliva) presenta algunos inconvenientes:

- Requiere extracción de sangre y preparación del suero.

- Requiere hacerse por personal especializado en laboratorios convenientemente equipados.

45 - No indica si el paciente tiene una enfermedad activa, sólo que en algún momento el sistema inmunitario ha estado en contacto con el virus.

- Las personas vacunadas tienen anticuerpos y por lo tanto dan positivo en la prueba a pesar de no haber contraído la enfermedad.

- La aparición de anticuerpos anti-HAV tiene lugar aproximadamente 4 semanas después de la infección (18, 21-23, 40) por lo que hay un período ventana de 4 semanas en las que la enfermedad no es detectable por

anticuerpos y el paciente además de estar incubando la enfermedad está excretando gran cantidad de virus en sus heces y puede ser el origen de un brote epidémico.

- Hay individuos portadores asintomáticos a los que no se les va a hacer la prueba de anticuerpos en el suero por no presentar síntomas pero que contribuyen a la propagación de la enfermedad.

5 Para solucionar todos estos problemas se ha desarrollado la presente invención consistente en un test rápido para detección de partículas virales o fragmentos del virus de la Hepatitis A en muestras fecales. Presenta las siguientes ventajas:

- No es necesaria la extracción de sangre y preparación del suero, basta con una muestra de deposiciones fecales.

10 - No se necesita equipamiento complejo de laboratorio ni personal especializado.

- Indica presencia de virus y por lo tanto enfermedad activa

- Se puede realizar en personas vacunadas.

- El período ventana se reduce de 4 semanas a solo unos días (ver figura 1).

- El virus puede ser identificado en las heces de pacientes asintomáticos.

15 - Es rápido (10 minutos) y fácil de llevar a cabo.

La identificación de partículas virales o fragmentos del HAV se puede llevar a cabo mediante técnicas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El "HAV-Antigen EIA" de Mediagnost (Reutlingen, Alemania) es un inmunoensayo tipo ELISA para la identificación de HAV en diversos tipos de muestra con cultivos celulares y heces. También se ha descrito la detección del HAV por identificación de secuencias de RNA mediante la utilización de una transcriptasa reversa (RT) y la PCR (Patente WO 2008145196). Sin embargo este tipo de pruebas presenta algunos inconvenientes que han hecho que su utilización sea muy limitada:

20

- Tiempo: el ELISA requiere entre 2 y 3 horas y la PCR unas 8-10 horas.

25 - Ambos necesitan complejos equipos de laboratorio disponibles únicamente en laboratorios especializados y personal experto en las dichas técnicas.

- El ELISA presenta una limitada sensibilidad puesto que es necesario diluir mucho la muestra

- Presentan un elevado número de falsos positivos. En el caso del ELISA todo resultado positivo tiene que ser reevaluado después de haber sido incubado con una solución neutralizante asegurando el efecto bloqueante de la misma.

30 Objeto de la invención

La presente invención se refiere en un aspecto a un dispositivo inmunocromatográfico para el diagnóstico de la hepatitis A en forma de tira con un sitio de aplicación de la muestra, una membrana porosa en la que se visualiza el resultado y un absorbente caracterizado porque:

35 a. se han inmovilizado anticuerpos específicos contra el virus de la Hepatitis A en la línea de test de la membrana porosa,

b. se ha impregnado un conjugado preparado con anticuerpos contra el virus de la Hepatitis A y una partícula marcadora corriente abajo del lugar de aplicación de la muestra

c. se han utilizado materiales cuyas características y tamaño de poro permiten el flujo de la materia particulada de las heces.

40 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esquema de las etapas del método de diagnóstico. El dispositivo o vial específico para la toma de muestras fecales (Figura 1A) es un vial de plástico de unos 3-4 mL de capacidad, en el que previamente se ha dispensado 1 ml de diluyente para la dispersión, con un tapón a rosca que dispone de un vástago cuyo extremo, diseñado al efecto, permite la recolección de una porción de heces (Figura 1B) sólidas o semisólidas y su introducción en el vial. Tras esto, se cierra y se agita vigorosamente (Figura 1C) hasta la completa dispersión de la muestra. Por último, se rompe la parte superior del dispositivo (Figura 1D) y se añaden unas gotas sobre el lugar de aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico (Figura 1E).

45

Figura 2: Vistas del dispositivo inmunocromatográfico. Figura 2A: Vista superior del dispositivo inmunocromatográfico en formato tira. Dicha tira incluye los siguientes elementos: un material absorbente (1), membrana porosa (2) con una línea de test (3) y otra de control (4), un lugar de aplicación de la muestra (5) y un lugar para el conjugado anticuerpo-marcador (6). Figura 2B: Vista de la sección del dispositivo inmunocromatográfico en formato tira en la que se distinguen además de los elementos descritos en la Figura 2A, el soporte plástico (7). Figura 2C: Vista proyectada del dispositivo inmunocromatográfico, en la que se distinguen los elementos descritos en la Figuras 2A y 2B.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en un aspecto a un dispositivo inmunocromatográfico para el diagnóstico de la hepatitis A (dispositivo inmunocromatográfico de la invención) en forma de tira con un sitio de aplicación de la muestra, una membrana porosa en la que se visualiza el resultado y un absorbente caracterizado porque:

- a. se han inmovilizado anticuerpos específicos contra el virus de la Hepatitis A en la línea de test de la membrana porosa,
- b. se ha impregnado un conjugado preparado con anticuerpos contra el virus de la Hepatitis A y una partícula marcadora corriente abajo del lugar de aplicación de la muestra
- c. se han utilizado materiales cuyas características y tamaño de poro permiten el flujo de la materia particulada de las heces.

Utilizando el dispositivo inmunocromatográfico de la presente invención se lleva a cabo un método de diagnóstico de la Hepatitis A que consiste en: la toma de una porción representativa de una muestra de heces, su dispersión en un diluyente específico, la aplicación de esta dispersión de la muestra en el dispositivo inmunocromatográfico de la invención, la formación de un complejo entre los anticuerpos del dispositivo y los antígenos de la muestra y la visualización de este complejo en la membrana del dispositivo.

El dispositivo inmunocromatográfico de la presente invención es de un solo uso. No se requiere ningún tipo de instrumentación para llevar a cabo el método o interpretar el resultado. Como muestra se utilizan heces.

El tiempo de preparación de la muestra es de unos dos minutos y el tiempo de desarrollo de la prueba es de 5 a 10 minutos, lo que significa entre 10 y 20 veces menos que los ensayos ELISA, mucho más complejos de llevar a cabo y necesitan de instrumentación de laboratorio.

Por su sencillez la prueba se puede llevar a cabo en la consulta del médico incluso en guarderías o lugares donde se sospeche un brote epidémico.

La prueba se puede realizar antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad en individuos sospechosos o susceptibles de haber sido infectados por el HAV por estar cerca de un foco de la enfermedad o por pertenecer a grupos de riesgo.

La prueba también se puede realizar en cuanto aparezcan los primeros síntomas: especialmente diarrea, pero también pérdida de apetito, fatiga, dolor abdominal, náuseas, vómitos, orina oscura o heces pálidas (sin color).

La prueba funciona mejor antes de que aparezcan los síntomas de hepatitis, típicamente ictericia ó también altos niveles de bilirrubina en sangre y alta actividad aminotransferasa en el suero sanguíneo.

El método de diagnóstico de la Hepatitis A llevado a cabo utilizando el dispositivo inmunocromatográfico de la invención es útil durante el período de incubación de la enfermedad en el que la concentración del virus en las heces puede ser elevada.

Puesto que el virus se puede detectar en las heces antes de la aparición de los síntomas, el método es especialmente útil para la prevención de la enfermedad y la gestión de los brotes epidémicos para conocer con prontitud y con antelación a la aparición de los síntomas el origen y la magnitud del foco epidémico.

De igual manera, el dispositivo inmunocromatográfico de la invención es adecuado para establecer procedimientos de vigilancia precoz de aparición de la enfermedad especialmente en áreas de alta prevalencia del virus.

Para la realización del ensayo se dispersa una porción la muestra de heces en el diluyente en una proporción aproximada 1/10. Si la muestra es líquida 100 µL de muestra se mezclan con 1 mL del diluyente. Si la muestra es sólida se separan unos 100 mg de muestra con la ayuda de una espátula y se dispersan en 1 mL de diluyente.

Resulta muy conveniente la utilización de un dispositivo o vial específico para la toma de muestras fecales. Este dispositivo es un vial de plástico de unos 3-4 mL de capacidad, en el que previamente se ha dispensado 1 ml de diluyente para la dispersión, con un tapón a rosca que dispone de un vástago cuyo extremo, diseñado al efecto,

permite la recolección de una porción de heces sólidas o semisólidas y su introducción en el vial. En el documento de la patente US 5543115 se puede observar una descripción más detallada de un dispositivo similar.

5 Una vez introducida la muestra en el vial se cierra con el tapón a rosca y se agita vigorosamente. Tras esto se rompe la parte superior del tapón y por la apertura creada se añaden 3-4 gotas de la dispersión de heces sobre la zona de aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico.

Después de la aplicación de la muestra se esperan 10 minutos y se interpreta el resultado. El test se considera negativo si solo aparece una sola línea (por ejemplo, azul) en la ventana de resultados y positivo si aparecen dos líneas (por ejemplo, una roja y otra azul).

10 Los dispositivos inmunocromatográficos para la detección tanto de antígenos como de anticuerpos han sido descritos anteriormente (por ejemplo, en la patente EP 1248112). Para la detección del virus HAV o sus fragmentos se pueden utilizar anticuerpos monoclonales o policlonales o una combinación de ambos. En una realización preferente se utiliza un único anticuerpo monoclonal anti-HAV. Este anticuerpo monoclonal (HA1) se ha desarrollado utilizando extractos semipurificados de cultivos in vitro del virus de la Hepatitis A. El anticuerpo monoclonal obtenido presenta una elevada afinidad y especificidad frente a una porción de la proteína estructural del virus VP1.

15 En una realización preferente, este anticuerpo monoclonal (HA1) es utilizado tanto en la membrana como en el conjugado. El conjugado se prepara con micropartículas coloreadas y es depositado en uno de los materiales del dispositivo inmunocromatográfico aguas abajo del lugar de aplicación de la muestra y actúa como fase móvil. El mismo anticuerpo se inmoviliza sobre la membrana porosa y actúa como fase fija, en que se produce la captura inmunológica de las partículas virales o fragmentos del virus. La membrana y el material con el conjugado son montados junto con otros materiales absorbentes o adhesivos sobre un soporte plástico que se es cortado en forma tira.

20 En una realización particular, la invención se refiere al dispositivo inmunocromatográfico de la invención dispuesto en el interior de una carcasa de plástico que lo protege.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de la Hepatitis A que comprende el dispositivo inmunocromatográfico de la invención en el interior de una carcasa de plástico y un diluyente para la dispersión de la muestra fecal. En una realización particular de dicho kit, el diluyente para la dispersión de la muestra fecal va en un vial específico para la toma de muestras fecales.

Ejemplos

30 A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

EJEMPLO 1.

Preparación y purificación de anticuerpos monoclonales anti-HAV

35 El anticuerpo monoclonal HA1 se obtuvo a partir del hibridoma del mismo nombre. La obtención del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal HA1 se realizó mediante protocolos conocidos según el método de fusión celular y fusión de los clones obtenidos que fue inicialmente descrito por Köhler y Milstein en 1975 (Köhler G, Milstein C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature. 1975 Aug 7;256 (5517):495-7).

40 Ratones del tipo BALB/c fueron inmunizados con la dosis proporcional la vacuna Havrix (GlaxoSmithKline). Los linfocitos de los ratones inmunizados fueron fusionados con células mielómicas de la línea SP20 y los hibridomas obtenidos fueron seleccionados mediante técnicas ELISA. Los pocillos de una placa microtiter de 96 pocillos fueron tapizados con anticuerpo policlonal de conejo anti-HAV en tampón carbonato 100 mM de pH 9 a 37 grados durante 2 h. A estos pocillos el extracto viral semipurificado que se describe posteriormente. Tras su lavado se añaden las distintas muestras de cultivo de hibridomas y la presencia del anticuerpo anti-HAV se revela utilizando un conjugado anti-mIgG con peroxidasa (Sigma) y el sustrato correspondiente.

45 Se seleccionaron los hibridomas que mayor afinidad y que mejor especificidad presentaron. Entre estos se seleccionaron los más productores y los que mejores prestaciones ofrecieron en los test de estrés térmico y velocidad de reacción frente al antígeno.

50 El extracto semipurificado de HAV se obtuvo a partir de un cultivo de células MRC-5 en medio mínimo esencial (Eagle) suplementado con suero bovino fetal al 10%, que fueron inoculadas con el virus de la Hepatitis A. Se incubó durante varios días a 37 °C con 5% de CO₂. Las fueron tratadas con proteasas y el virus fue parcialmente purificado por centrifugación.

El hibridoma seleccionado HA1 fue cultivado en medio RPMI-HT durante varios días a 37 grados con 5% de CO₂. A partir del medio de cultivo fue purificado el anticuerpo por cromatografía de afinidad a proteína A según las instrucciones del fabricante de la columna (GE Healthcare) tras lo que fue dializado en PBS de pH 7,4.

EJEMPLO 2:

5 Preparación del conjugado

Se preparó un conjugado del anticuerpo HA1 con micropartículas de poliestireno. Se utilizaron partículas coloreadas con grupos carboxilo en su superficie de 300 nm de diámetro nominal. 1 mL de partículas al 10 % es lavado por centrifugación y resuspensión en tampón MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico) 10 mM de pH 6 y se le añadió EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) hasta una concentración de 5 mM. Se incubó 1 h a 10 37 grados y se retira el exceso de reactivo por centrifugación. Las partículas activadas se resuspenden en MES 10 mM de pH 6 y se les añade anticuerpo monoclonal hasta una concentración superficial de 2 mg/m² tras lo que se incuban 4 h y se lavan en Tween 20 al 0,1%. Las partículas así obtenidas se diluyen en una solución que contiene sacarosa 10%, albúmina bovina 2%, PEG-6000 1% y Tween-20 2% en tampón TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) de pH 8, hasta una concentración de 0,05%.

15 Esta solución se deposita a razón de 15 µL/cm en un material bobinado de fibras de poliéster no entretejidas de 29 mm de ancho que se seca durante 24 h en una cámara a 30 grados y 20 % de humedad relativa.

EJEMPLO 3.

Preparación de las líneas de test y control.

20 El anticuerpo HA1 dializado en tampón fosfato salino (PBS) se lleva hasta una concentración de 1 mg/mL y se deposita linealmente en una membrana de nitrocelulosa laminada de 25 mm de ancho y de tamaño de poro entre 10 y 30 micrómetros a razón de 1 microL/cm tras lo cual se seca durante 24 h en una cámara a 30 grados y 20 % de humedad relativa.

Paralelamente se deposita y en las mismas condiciones se deposita anticuerpo policlonal de conejo anti-mIgG que servirá como línea de control.

25 EJEMPLO 4.

Montaje del test inmunocromatográfico.

30 El material con el conjugado, la membrana y el material absorbente se montan conforme indican las figuras 2 y 3 sobre un soporte plástico con una lámina adhesiva y las tiras son cortadas transversalmente a su montaje a una anchura de 4 mm. Opcionalmente la tira puede colocarse en el interior de un dispositivo de plástico a modo de carcasa que la protege y facilita su utilización.

Se prepara una solución para la dispersión de las muestras de heces consistente en una disolución acuosa de cloruro de sodio 300 mM, Tritón X-100 al 1% y anticuerpos IgG inespecíficos de ratón 100 µg/mL en un tampón TRIS 200 mM a un pH de 9. Esta preparación se dispensa en viales para la toma de muestra a razón de 1 mL/vial.

35 EJEMPLO 5.

Detección de HAV

40 Se preparara diluciones seriadas 1/2 de HAV en el diluyente de dispersión de muestras descrito en el apartado anterior. 100 µL de estas diluciones se aplican a los dispositivos inmunocromatográficos de la invención y se deja progresar el ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C) tras lo cual se procede a interpretar el resultado mediante apreciación visual de aparición de la línea de test. Se realiza la misma operación pero diluyendo el HAV en un pool de muestras de heces dispersadas aproximadamente 1/10 en el mismo tampón. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

[HAV] en U/mL	En tampón	En heces/tampón
128	+	+
64	+	+
32	+	+
16	+	+
8	+	+
4	+	+
2	+/-	+/-
1	-	-
0	-	-

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo inmunocromatográfico para el diagnóstico de la hepatitis A en forma de tira con un sitio de aplicación de la muestra, una membrana porosa en la que se visualiza el resultado y un absorbente caracterizado porque:
 - a. se han inmovilizado anticuerpos específicos contra el virus de la Hepatitis A en la línea de test de la membrana porosa,
 - b. se ha impregnado un conjugado preparado con anticuerpos contra el virus de la Hepatitis A y una partícula marcadora corriente abajo del lugar de aplicación de la muestra
 - c. se han utilizado materiales cuyas características y tamaño de poro permiten el flujo de la materia particulada de las heces.
2. Dispositivo inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación anterior, dispuesto en el interior de una carcasa de plástico que lo protege.
3. Kit de diagnóstico de la Hepatitis A que comprende el dispositivo inmunocromatográfico de la reivindicación 2 y un diluyente para dispersión de la muestra fecal.
4. Kit según la reivindicación anterior, donde el diluyente para dispersión de la muestra fecal va en un vial específico para la toma de muestras fecales.

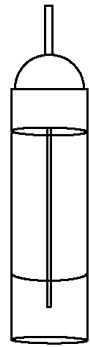


FIGURA 1A

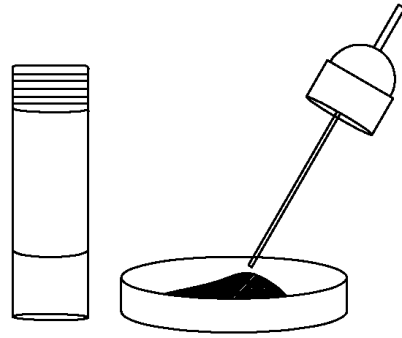


FIGURA 1B

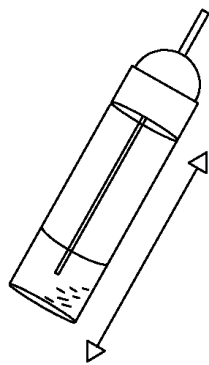


FIGURA 1C

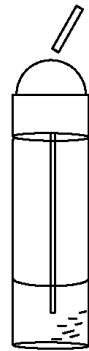
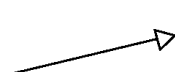


FIGURA 1D

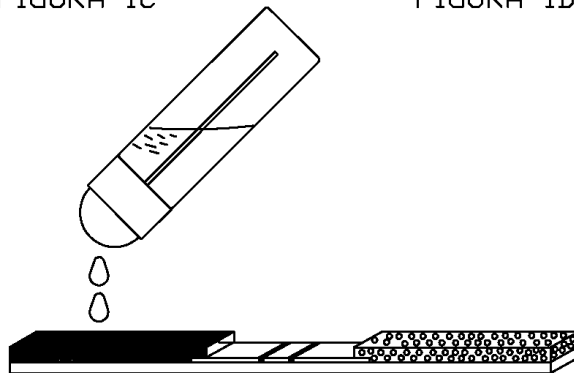


FIGURA 1E

FIGURA 1

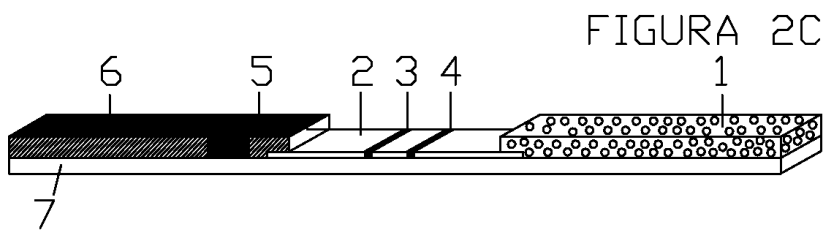
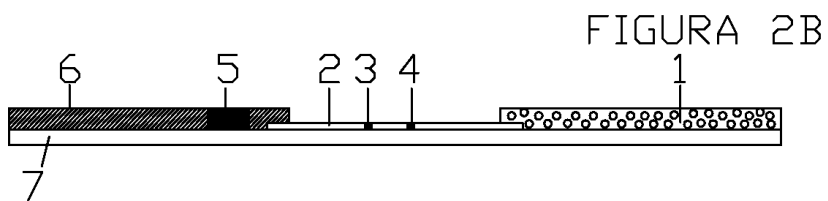
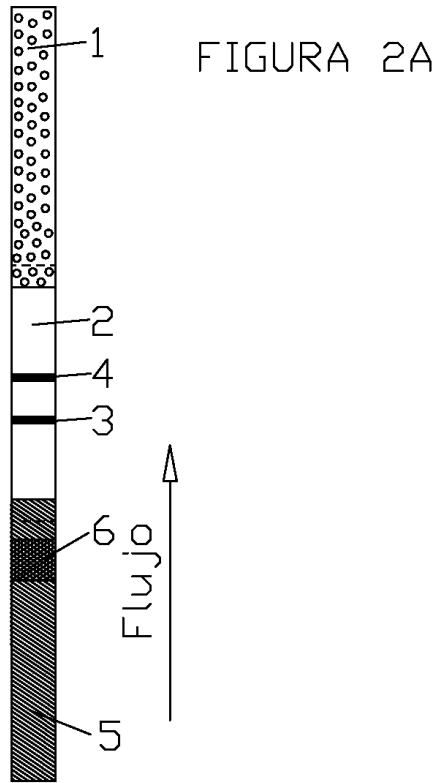


FIGURA 2