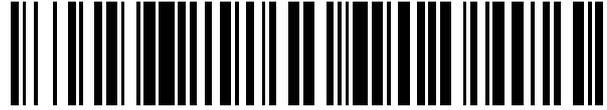


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 591**

51 Int. Cl.:

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10250953 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2259066**

54 Título: **Reactivos para ensayos de combinación para antígenos-anticuerpos VHC**

30 Prioridad:

20.05.2009 US 469568

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.02.2014

73 Titular/es:

**ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
1001 U.S. Route 202
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, JIAN y
YANG, JIANPING**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 443 591 T3

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

Reactivos para ensayos de combinación para antígenos-anticuerpos VHC**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona, en general, con inmunoensayos para la detección y el diagnóstico de la infección por el VHC. En particular, la presente invención se relaciona con inmunoensayos de combinación, reactivos y kits basados en el uso de un detergente no iónico para la detección simultánea de antígenos VHC y anticuerpos anti-VHC en una muestra.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus de la hepatitis C (VHC), un virus ARN de una sola hélice, es el agente etiológico de la hepatitis no A, no B, transmitida por la sangre. La infección activa crónica con el VHC progresa con frecuencia a cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Los estudios epidemiológicos indican que el VHC infecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo, con una elevada incidencia de enfermedad crónica que progresa en último lugar (en más de un 50% de los casos) hacia la muerte. Sin embargo, dado que se trata principalmente de una enfermedad transmitida por la sangre, es posible identificar el patógeno en muestras de sangre y eliminar la transmisión de la enfermedad a través de la transfusión sanguínea. Tras la exposición al patógeno VHC, inicialmente no hay evidencia de la presencia del virus, es decir, que no hay ARN vírico ni marcadores serológicos detectables. Se hace referencia a esto como el "período de ventana" (PV). En general, a los 10 días de la exposición al VHC, se puede detectar el ARN vírico, mientras que los anticuerpos anti-VHC se hacen detectables aproximadamente 70 días después (Busch MP y Dodd RY, *Transfusion* 40(10): 1157-1160, 2000). Para prevenir la propagación de la infección por el VHC, es extremadamente importante tomar en consideración este hecho observable y establecer una prueba fiable de rastreo en sangre, que estrecharía la ventana de detección. Desde la comercialización de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAN) que detectan el ARN del VHC, se ha reducido dramáticamente el índice de infección por el VHC después de una transfusión. Otros métodos se basan en el rastreo serológico de la sangre para detectar la presencia del antígeno del núcleo del VHC (Ortho HCV Core Antigen ELISA, Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey) o de anticuerpos contra los polipéptidos del VHC (Ortho HCV 3.0 ELISA, Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey) en suero o plasma de pacientes.

Según una investigación realizada por Seme *et al.* (*J. Clin. Virol.* 32(2): 92-101, 2005), el ensayo de primera generación para el antígeno del núcleo del VHC detecta la infección por VHC con sensibilidad y límites de detección comparables a las técnicas de ácidos nucleicos (TAN). Estos ensayos detectan la infección por VHC entre 40 y 50 días antes que los ensayos actuales de tercera generación de rastreo de anticuerpos contra el VHC. Aunque el ensayo de primera generación para el antígeno del núcleo del VHC, diseñado para rastrear sangre, ha reducido significativamente el período de ventana, sólo detecta antígeno del núcleo en la fase de preseroconversión o de postseroconversión temprana. Además, el ensayo de primera generación para el antígeno del núcleo del VHC no puede detectar el antígeno del núcleo cuando el antígeno forma inmunocomplejos con anticuerpos anti-núcleo en la fase de seroconversión tardía. Claramente, es deseable disponer de un ensayo de serología combinada que pueda detectar el antígeno del núcleo del VHC en la fase de preseroconversión, así como anticuerpos anti-VHC en la fase de seroconversión, estrechando así el PV significativamente. Esta prueba de serología combinada puede ser especialmente un método valioso de rastreo de sangre en escenarios en los que no se puede llevar a cabo la prueba TAN debido a falta de equipamiento o de competencia.

Dicho ensayo combinado de antígenos y anticuerpos VHC representará una mejora significativa sobre el método actual de rastreo serológico de sangre de tercera generación (Ortho HCV 3.0 ELISA, Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey) con respecto al estrechamiento del PV. US 2003/049608 A1 y US 2003/152948 A1 describen un ensayo de combinación para antígenos-anticuerpos de la Hepatitis C para la detección precoz de la infección, en donde se detecta el anticuerpo utilizando un formato indirecto, es decir, utilizando un antígeno de captura y un anticuerpo anti-IgG secundario marcado (Ag-Ab-2^o Ab). Sin embargo, uno de los desafíos para que el ensayo combinado de antígeno y anticuerpo sea eficaz es seleccionar un detergente apropiado para romper los viriones del VHC y liberar el antígeno sin interferir con la captura de los anticuerpos anti-VHC por antígenos VHC recombinantes.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a inmunoensayos de combinación, reactivos y kits para la detección simultánea de antígenos del VHC y de anticuerpos anti-VHC en una muestra.

La singularidad de los inmunoensayos de combinación de la presente invención radica principalmente en el uso de un detergente no iónico que expone o libera de manera efectiva el antígeno del núcleo del VHC a partir de viriones en una muestra sin ningún procesamiento previo de la muestra, y además no interfiere con la captura de anticuerpos anti-VHC por antígenos VHC recombinantes, permitiendo así la medición simultánea del antígeno del núcleo del VHC y de anticuerpos anti-VHC.

Los detergentes no iónicos adecuados para uso en los ensayos de combinación de la presente invención son miembros de la familia de los óxidos de *N*-alquil-*N,N*-dimetilamina. En una realización preferida, el ensayo de combinación emplea *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO). En otras realizaciones, se emplea un derivado o equivalente funcional o químico de la LDAO.

Por consiguiente, la presente invención proporciona inmunoensayos de combinación en diversos formatos y reactivos y kits relacionados para la detección simultánea de antígenos del VHC y de anticuerpos anti-VHC en una muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se dirige a inmunoensayos de combinación para antígenos-anticuerpos VHC y métodos, reactivos y kits relacionados.

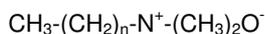
Los inmunoensayos de combinación o ensayos "combo" para antígenos-anticuerpos VHC se refieren a inmunoensayos que detectan simultáneamente tanto antígenos del VHC como anticuerpos anti-VHC en una muestra en un solo ensayo. Los métodos de ensayo de combinación antígeno/anticuerpo se basan en la identificación y el uso de anticuerpos y antígenos VHC antigénicos e inmunogénicos que están presentes durante las fases iniciales de la seroconversión del VHC, aumentando así la precisión de la detección y reduciendo la incidencia de resultados falsos durante el período de ventana.

La presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de detergentes no iónicos adecuados y efectivos para uso en un inmunoensayo de combinación para la detección sensible y precisa de la infección precoz por el VHC. Dichos detergentes rompen eficazmente las partículas víricas del VHC en una muestra de ensayo y, como resultado, el antígeno del núcleo liberado es capturado y detectado eficazmente por sondas de anticuerpos monoclonales. Al mismo tiempo, los detergentes no tienen ningún impacto negativo sobre la detección de anticuerpos ya sea por lixiviación de los antígenos recombinantes depositados sobre la fase sólida o por interferencia con la captura de anticuerpos anti-VHC durante el ensayo de combinación. Por lo tanto, los ensayos de combinación proporcionados por la presente invención permiten la detección simultánea tanto de antígenos del VHC (incluyendo el antígeno del núcleo) como de anticuerpos anti-VHC en una muestra en un solo ensayo. En comparación con los ensayos existentes, incluidos los ensayos dirigidos a la detección de antígenos del VHC o de anticuerpos anti-VHC por separado, los ensayos de combinación de la presente invención obvian la necesidad de realizar dos ensayos independientes y proporcionan una mayor sensibilidad y especificidad para la detección del VHC.

Según la presente invención, como detergentes no iónicos adecuados para uso en un inmunoensayo de combinación, se incluyen miembros de la familia de los óxidos de *N*-alquil-*N*-alquil'-*N*-metilamina, que también se conocen como detergentes zwitteriónicos. Los grupos alquilo generalmente contienen no más de 15 átomos de carbono cada uno.

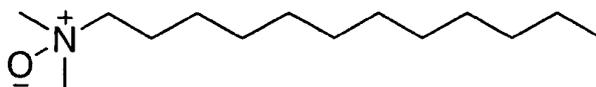
En una realización, el detergente es un óxido de *N*-alquil-*N*-alquil'-*N*-metilamina donde el grupo alquilo es un grupo alquilo monocatenario o ramificado de 9 a 13 átomos de carbono y el otro grupo alquilo ("el grupo alquilo") es un grupo alquilo monocatenario o ramificado de 1 a 13 átomos de carbono. En otra realización, uno o ambos de los grupos alquilo del óxido de *N*-alquil-*N*-alquil'-*N*-metilamina son grupos alquilo sustituidos.

En una realización preferida, el detergente es óxido de *N*-alquil-*N,N*-dimetilamina, caracterizado por la fórmula:



donde la longitud de la cadena de alquilo se define por el número *n*, que puede ser de 9 a 13, o preferiblemente de 10 a 12; más preferiblemente *n* es 11. El número "n" es al menos 9, preferiblemente al menos 10 y más preferiblemente al menos 11.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, el detergente no iónico empleado en un inmunoensayo de combinación por el VHC es el *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO), que tiene la fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{O}^-$, que se representa gráficamente como:



Se puede aportar un detergente no iónico a un ensayo de combinación de cualquier manera apropiada. Por ejemplo, se puede añadir el detergente a una muestra de ensayo antes de poner en contacto la muestra con reactivos de detección, tales como antígenos y anticuerpos de captura. Alternativamente, se puede mezclar el detergente con

una muestra de ensayo simultáneamente a la adición de otros reactivos para detección. En una realización preferida, se aporta el detergente en una solución (o “diluyente”), que se usa para diluir o suspender una muestra de ensayo biológica antes de poner en contacto la muestra con antígenos y anticuerpos de captura. Independientemente de cómo se proporcione un detergente no iónico al ensayo, la concentración del detergente en la mezcla en solución cuando se produce el contacto con la muestra de ensayo debe ser del 0,1% al 2% (p/v), preferiblemente de al menos el 0,3% (p/v), pero no más del 1% (p/v), más preferiblemente de aproximadamente el 0,5% (p/v).

Como muestras biológicas que pueden ser estudiadas en cuanto al VHC usando los ensayos de combinación de la presente invención, se incluye cualquier muestra sospechosa de contener viriones, antígenos o anticuerpos VHC. La muestra puede ser un fluido o un tejido biológico, incluyendo fluidos corporales, tales como sangre entera, sangre entera desecada, suero, plasma u otros componentes de la sangre, incluyendo hematíes, leucocitos y plaquetas, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo y tejido hepático, entre otros. Las muestras pueden ser tratadas de cualquier modo que resulte apropiado antes de su utilización en el ensayo.

Según la presente invención, la parte de detección de anticuerpos anti-VHC del ensayo de combinación emplea generalmente al menos un (es decir, uno o más) antígeno de captura que se une, y por lo tanto “captura”, a los anticuerpos anti-VHC de la muestra. Los antígenos de captura son generalmente péptidos antigénicos (que contienen uno o más epitopos) derivados de una proteína del VHC codificada por el genoma del VHC. La secuencia de la totalidad del genoma del VHC y la secuencia de la poliproteína del VHC codificada están documentadas en el GenBank (acceso #M62321 y #AAA45676, respectivamente) y están disponibles para los expertos en la técnica.

Habría que hacer notar que el término “proteína del VHC”, tal como se utiliza aquí, incluye tanto una proteína de longitud completa nativa codificada por el genoma del VHC (v.g., una proteína estructural o no estructural, o un precursor de una proteína estructural o no estructural) como un polipéptido de fusión artificial de dos proteínas del VHC nativas o fragmentos de las mismas (v.g., una fusión de NS3 y de NS4 parcial, a la que también se hace aquí referencia como “NS3/NS4”).

El término “antígeno del VHC” o “antígenos del VHC”, tal como se utiliza aquí en relación a los antígenos presentes en una muestra de un individuo infectado por el VHC, puede corresponder a proteínas del VHC de longitud completa o a fragmentos antigénicos de las mismas.

Hablando en general, un fragmento peptídico de una proteína del VHC es antigénico y es capaz de unirse a los respectivos anticuerpos y de capturarlos cuando el fragmento tiene al menos 6 ó 7 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 8, o al menos 9, o al menos 10, aminoácidos, más preferiblemente al menos 12, 15 ó 20 aminoácidos. Los antígenos del VHC de captura pueden contener más de un epitopo. El término “epitopo” es bien conocido en la técnica y se refiere a una región molecular o determinante estructural sobre la superficie de un antígeno capaz de unirse a un anticuerpo y de provocar una respuesta inmune. Se pueden producir antígenos de captura recombinantemente o por síntesis química convencional.

En determinadas realizaciones, el antígeno de captura es un fragmento antigénico de una proteína del VHC seleccionada entre el antígeno del núcleo, E1, E2, NS2, NS3, NS4 o NS5. En una realización preferida, el antígeno de captura deriva del antígeno del núcleo, o es una proteína de fusión NS3/NS4 como se ilustra en los ejemplos que se darán más adelante. En otra realización, se usan dos o más péptidos como antígenos de captura, los cuales pueden derivar de las mismas o de diferentes proteínas del VHC.

Se puede depositar un antígeno de captura sobre una fase sólida antes de la realización del ensayo. Alternativamente, se conjuga el antígeno de captura con un reactivo apropiado, v.g., biotina, que puede mediar en la unión a una fase sólida después de que el antígeno de captura haya formado un complejo con (es decir, haya capturado) anticuerpos anti-VHC en una fase líquida, v.g., en un formato de ELISA en cóctel.

Como ejemplos de fases sólidas adecuadas para uso en los inmunoensayos de la presente invención, se incluyen materiales tanto porosos como no porosos, tales como, por ejemplo, partículas de látex, partículas magnéticas, perlas, membranas y pocillos de microtitulación. La elección del material de fase sólida puede ser determinada en base al formato de ensayo deseado.

Cuando se pone en contacto un antígeno de captura con una muestra de ensayo, si hay presencia de anticuerpos anti-VHC en la muestra, dichos anticuerpos se unen al antígeno de captura. Los anticuerpos capturados por el antígeno de captura, es decir, los anticuerpos capturados, pueden ser detectados usando una serie de enfoques.

Un enfoque utiliza un segundo anticuerpo, que reconoce y se une a los anticuerpos VHC capturados. El segundo anticuerpo, v.g., IgG antihumana, está conjugado a un medio generador de señal. Cuando el segundo anticuerpo se une a un (primer) anticuerpo capturado, el medio generador de señal genera una señal mensurable, que indica la presencia del primer anticuerpo en la muestra de ensayo.

Otro enfoque utiliza un segundo antígeno, que puede estar conjugado a un medio generador de señal y al que también se hace referencia como un “antígeno de detección”. Al igual que los antígenos de captura, un antígeno de

5 detección puede también contener más de un epitopo, siempre que esté presente un epitopo común tanto en el
 10 antígeno de captura como en el antígeno de detección. Adicionalmente, se pueden usar uno o más antígenos de
 antígeno de captura-anticuerpo-antígeno de detección, el medio generador de señal del antígeno de detección
 puede generar una señal mensurable, que indica la presencia del anticuerpo en la muestra de ensayo. Este enfoque
 de "sándwich de Ag" se basa en la capacidad de un anticuerpo anti-VHC para unirse simultáneamente a dos
 epitopos idénticos en dos moléculas de antígeno separadas. Este enfoque de sándwich de Ag permite la detección
 altamente específica de los anticuerpos anti-VHC, y, debido a esta elevada especificidad, este enfoque permite el
 uso de un mayor volumen de muestra de ensayo, lo que a su vez permite una detección más sensible de antígenos
 VHC presentes en la muestra.

15 Este medio generador de señal es detectable por sí mismo o puede reaccionar con uno o más compuestos para
 generar una señal detectable. Como ejemplos de medio generador de señal, se incluyen cromógenos, radioisótopos,
 compuestos quimioluminiscentes, enzimas (v.g., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante,
 beta-galactosidasa y ribonucleasa) o un compañero de un par de unión (tal como biotina o estreptavidina). Cuando
 se usa una enzima como medio generador de señal (v.g., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), la
 adición de un substrato cromogénico, fluorogénico o luminogénico da como resultado la generación de una señal
 detectable.

20 Según la presente invención, generalmente se consigue la parte de detección de antígenos VHC del ensayo de
 combinación usando uno o más pares de un anticuerpo de captura y un anticuerpo conjugado en un formato en
 sándwich de anticuerpos.

25 El anticuerpo conjugado está unido a cualquiera de los medios generadores de señal antes descritos. Se puede
 depositar el anticuerpo de captura sobre una fase sólida, es decir, la misma fase sólida que el/los antígeno(s) de
 captura antes descrito(s), antes de llevar a cabo el ensayo. Alternativamente, se conjuga el anticuerpo de captura
 con un reactivo apropiado, v.g., biotina, que puede mediar en la unión a una fase sólida después de que el
 anticuerpo de captura haya formado un complejo con (es decir, haya capturado) un antígeno VHC en una fase
 líquida que ya está unido o que se une posteriormente a un anticuerpo conjugado. En cualquiera de estos enfoques,
 una vez se ha formado y se ha capturado sobre una fase sólida un sándwich anticuerpo de captura-antígeno-
 anticuerpo conjugado, el medio generador de señal puede generar una señal mensurable, que indica la presencia
 del antígeno en la muestra de ensayo.

35 En cada par, puede haber uno o más anticuerpos de captura que reconozcan cada uno diferentes epitopos y uno o
 más anticuerpos conjugados que reconozcan cada uno diferentes epitopos. Con objeto de permitir la unión
 simultánea de los anticuerpos de captura y de los anticuerpos conjugados a la misma molécula de antígeno y la
 formación de un complejo en sándwich, el anticuerpo o los anticuerpos de captura deben reconocer epitopos
 diferentes a los reconocidos por el anticuerpo o los anticuerpos conjugados en el mismo par, pero los epitopos
 reconocidos por los anticuerpos de captura y los anticuerpos conjugados, respectivamente, deben estar en el mismo
 antígeno VHC para formar un sándwich de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos de captura
 y los anticuerpos conjugados pueden dirigirse a epitopos en cualquier proteína del VHC o polipéptido estructural o no
 estructural del VHC codificado por el genoma del VHC. Preferiblemente, los anticuerpos se dirigen a epitopos en una
 proteína del VHC seleccionada entre el antígeno del núcleo, E1, E2, NS2, NS3, NS4 o NS5. En una realización
 especialmente preferida, los anticuerpos de captura y los anticuerpos conjugados en un par se dirigen a, es decir, se
 unen específicamente a, epitopos en el antígeno del núcleo del VHC. En otra realización, se usan dos o más pares
 de anticuerpos de captura y anticuerpos conjugados, y al menos uno de los pares incluye un anticuerpo de captura y
 un anticuerpo conjugado dirigidos a epitopos en el antígeno del núcleo del VHC.

50 Los anticuerpos de captura y los anticuerpos conjugados pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos
 policlonales o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, se emplean anticuerpos monoclonales.

55 Para realizar un ensayo de combinación según la presente invención, se dispone de un antígeno de captura y de un
 anticuerpo conjugado o un antígeno de detección para detectar anticuerpos anti-VHC, un anticuerpo de captura y un
 conjugado de anticuerpo específico para el VHC para detectar antígenos del VHC y un detergente no iónico
 apropiado. Se pone en contacto una muestra de ensayo con el detergente y los reactivos de captura y conjugados,
 secuencial o simultáneamente, y se puede correlacionar la señal generada por los reactivos conjugados con un
 diagnóstico de infección por el VHC.

60 En una realización específica, se dispone de un antígeno de captura, un antígeno de detección, un anticuerpo de
 captura y un anticuerpo conjugado y un detergente no iónico apropiado. En una realización preferida, tanto el
 antígeno de captura como el anticuerpo de captura están depositados sobre (se unen covalente o no
 covalentemente a) una fase sólida. Se pone en contacto una muestra de ensayo con los reactivos de captura unidos
 a la fase sólida en presencia del detergente. Simultáneamente, o preferiblemente a continuación, se añaden los
 reactivos conjugados (es decir, el antígeno de detección y el anticuerpo conjugado) a la mezcla de reacción. Se
 puede correlacionar la señal generada como resultado de la unión de los reactivos conjugados también a la fase
 sólida con un diagnóstico de infección por el VHC.

Habría que hacer notar que los reactivos de captura y conjugados tendrían que ser seleccionados de manera que se evitaran la reactividad cruzada y los resultados falso positivos. Por ejemplo, los antígenos del VHC empleados para detectar anticuerpos anti-VHC derivan de un polipéptido del VHC diferente del polipéptido contra el cual se dirigen los anticuerpos de captura y conjugados. Alternativamente, cuando los antígenos empleados para la detección de anticuerpos derivan de la misma proteína del VHC (*v.g.*, el antígeno del núcleo) como proteína contra la cual se producen los reactivos de anticuerpos, los antígenos usados para la detección de anticuerpos deben presentar epitopos que no sean reconocidos por los reactivos de anticuerpos usados para la detección de antígenos. Esencialmente, los epitopos a los que se unen los anticuerpos en la parte de detección de antígenos del ensayo no deben estar presentes en los antígenos usados para la detección de anticuerpos para el VHC.

La presente invención también proporciona kits que contienen los diversos reactivos antes descritos para llevar a cabo un ensayo de combinación con objeto de detectar simultáneamente antígenos del VHC y anticuerpos anti-VHC como ayuda para un diagnóstico de infección por el VHC.

Ejemplos:

Los siguientes ejemplos describen con detalle las ventajas y la importancia de la invención mediante el examen del detergente *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO) y de su eficacia para conseguir la liberación del antígeno del núcleo del VHC en un ensayo de antígenos, y de su compatibilidad con un ensayo de anticuerpos para el VHC. También se describe el uso del detergente *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO) en la medición simultánea del antígeno del núcleo del VHC y de anticuerpos para el VHC.

Hay que entender que los ejemplos que se presentan aquí a continuación tienen fines ilustrativos y no se pretende limitar con ellos el alcance de la presente invención.

Reactivos generales para la detección del antígeno del núcleo del VHC y de anticuerpos anti-VHC

Sistema de ensayo ORTHO HCV CORE ANTIGEN ELISA

Se usó Ortho HCV Core Antigen ELISA (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey) para la detección del antígeno del núcleo de la nucleocápside de la hepatitis C (antígeno del núcleo del VHC) en suero o plasma humano. Se usaron los anticuerpos monoclonales depositados sobre la fase sólida de los micropocillos para capturar el antígeno y se usaron los anticuerpos monoclonales secundarios conjugados a HRP para detectar el antígeno capturado. Se usó un diluyente de muestras que contenía detergente para exponer el antígeno del núcleo del VHC para su captura y detección sin ninguna etapa de pretratamiento.

Sistema de ensayo ORTHO HCV 3.0 ELISA

Ortho HCV 3.0 ELISA (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey) estaba destinado a la detección de anticuerpos para el virus de la hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano. Se usaron los antígenos VHC recombinantes c22 (aminoácidos 2-120, región del núcleo), c200 (aminoácidos 1192-1931, región NS3/NS4) y NS5 (aminoácidos 2054-2995) depositados sobre la fase sólida de los micropocillos para capturar los anticuerpos anti-VHC. Se usó el anticuerpo IgG murina anti-humana monoclonal conjugado a HRP para detectar el anti-VHC humano capturado. Este formato utiliza detergente Tween 20 en el diluyente de muestras.

Chiron RIBA HCV 3.0 SIA

Chiron RIBA HCV 3.0 SIA (Novartis Vaccines & Diagnostics, Emeryville, California) es un ensayo de inmunotransferencia en tira usado para la detección de anticuerpos para el virus de la hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano. Se inmovilizaron los antígenos o péptidos del VHC c22p (aminoácidos 10-53, región del núcleo), c33c (aminoácidos 1192-1457, región NS3), 5-1-1 y c100 (aminoácidos 1694-1735 y 1920-1935, respectivamente, región NS4) y NS5 (aminoácidos 2054-2995) como bandas individuales sobre tiras de ensayo para capturar los anticuerpos anti-VHC. El anticuerpo IgG murina anti-humana monoclonal conjugado a HRP detectó entonces los anti-VHC humanos capturados. El ensayo proporciona información adicional sobre la reactividad específica de anticuerpos hacia antígenos individuales de un espécimen reactivo en Ortho HCV 3.0 ELISA.

Antígenos

Se sintetizaron dos derivados peptídicos para cubrir la secuencia de la proteína del núcleo del VHC desde el aminoácido 10 hasta el aminoácido 45. Para HCC5N, la secuencia está descrita en la SEC. N° ID.: 1 (el extremo N tiene un grupo amino libre, en lugar de un grupo amino bloqueado por acetilación). HCC5N tiene dos residuos en el extremo C, norleucina y Cys, que no pertenecen a la proteína del núcleo del VHC. Para HCC5-b, la secuencia está descrita en la SEC. N° ID.: 2 (el extremo N tiene un grupo amino libre). HCC5-b tiene dos residuos en el extremo C, Gly y Lys (biotina), que no pertenecen a la proteína del núcleo del VHC. Se conjugó además HCC5N a BSA activada con SMCC a través de la Cys C-terminal de HCC5N en condiciones reductoras.

Se clonó helicasa NS3 del VHC recombinante (rNS3(h)), que cubría los residuos P1208 a T1657, y se expresó en *E. coli* como se ha descrito previamente (Jin, *Arch. Biochem. Biophys.* 323(1): 47-53, 1995). Se fusionó un marcador 6xHis al extremo N de la rNS3(h) para purificar la proteína (para dar como resultado la SEC. N° ID.: 3, que representa una proteína de fusión del marcador 6xHis y rNS3(h)). Se preparó una rNS3(h) conjugada a biotina usando EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, # Cat. 21335). Se determinó que la proteína conjugada tenía 3 biotinas por molécula de rNS3(h).

Anticuerpos monoclonales anti-núcleo del VHC

Se usaron cuatro anticuerpos monoclonales en el estudio. Se han descrito la producción y los sitios de reconocimiento de epítopos de los anticuerpos monoclonales C11-3, C11-7 y C11-14 en la Publicación de Patente Europea EP 0.967.484 A1. Ninguno de los sitios de reconocimiento de epítopos de estos anticuerpos monoclonales se encuentra dentro de los aminoácidos 10-45 del VHC. Se produjo el anticuerpo monoclonal anti-VHC 12F11 frente a c22 recombinante. El sitio de reconocimiento de 12F11 está alrededor de los aminoácidos 58-72 del VHC (antígeno del núcleo). Se conjugaron los anticuerpos C11-14 y 12F11 a peroxidasa de rábano picante (HRP) usando procedimientos estándar.

Especímenes de VHC

(1) Especímenes anti-VHC con depleción de anti-c22 y anti-c33c

Se vio originalmente que los especímenes WHO Hu-a-c33c, 41530822, 41530832 y 41530883 eran anti-VHC fuertemente reactivos por Ortho HCV 3.0 ELISA y no reactivos por Ortho HCV Core Antigen ELISA. Se produjo una depleción de la porción anti-c22 (anti-núcleo del VHC) de los anticuerpos pasando el espécimen a través de una columna de afinidad en la que se habían conjugado resinas cromatográficas con antígeno del núcleo del VHC recombinante c22, el mismo antígeno que uno de los antígenos de revestimiento usados en el Ortho HCV 3.0 ELISA.

Se vio originalmente que los especímenes WHO Hu-a-c22, I-20 y 360650 eran anti-VHC fuertemente reactivos por Ortho HCV 3.0 ELISA y no reactivos por Ortho HCV Core Antigen ELISA. Se produjo una depleción de la porción anti-c33c (anti-NS3 parcial) de los anticuerpos pasando el espécimen a través de una columna de afinidad en la que se habían conjugado resinas cromatográficas con antígeno del núcleo del VHC recombinante c33, el mismo antígeno (c33c) inmovilizado en el Chiron RIBA 3.0 SIA y una versión más corta de uno de los antígenos de revestimiento (c200) usados en el Ortho HCV 3.0 ELISA.

(2) Especimen reactivo con el antígeno del núcleo del VHC

El Lote 16 de muestras reactivas con el antígeno del núcleo del VHC era un pool de plasma, formado por especímenes que mostraron ser no reactivos para anti-VHC por Ortho HCV 3.0 ELISA, reactivos para el ARN del VHC por PCR y reactivos para el antígeno del núcleo del VHC por Ortho HCV Core Antigen ELISA. La muestra de antígeno del núcleo del VHC 9160834 era un espécimen de plasma de Boston Biomedica Inc. (BBI). El espécimen dio no reactivo para anti-VHC por Ortho HCV 3.0 ELISA, reactivo para el ARN del VHC a aproximadamente 36.379.940 UI/ml o 189.175.500 copias/ml por Versant bDNA (Bayer) y reactivo para Ortho HCV Core Antigen ELISA.

(3) Paneles de seroconversión del VHC

Los paneles de seroconversión del VHC estudiados en los presentes estudios estaban todos ellos comercializados y fueron comprados a SeraCare Life Sciences, Inc. USA (BBI Diagnostics) y ZeptoMetrix Corporation, USA (antes Impath/BioClinical Partners, Inc.). Un panel de seroconversión del VHC estaba compuesto por sangrías seriadas de especímenes de sangre humana tomados de un individuo infectado con VHC. Los especímenes cubrían un período de anti-VHC no reactivo a reactivo.

Ejemplo 1: Detección de anticuerpos anti-VHC (un formato de ensayo indirecto)

Se realizaron los ensayos usando los reactivos de un kit Ortho HCV 3.0 ELISA. Se añadieron a cada pocillo 150 µl de diluyentes de muestras compuestos por un tampón basado en fosfatos que contenía detergente Tween 20, BSA, caseína, extractos de levaduras y otras proteínas, más 50 µl de muestra. Se incubaron las placas a 37°C durante 60 minutos y se lavaron luego 5 veces con un tampón de lavado que contenía PBS/Tween 20. A continuación, se añadieron a cada pocillo 200 µl de anticuerpo monoclonal IgG murina anti-humana conjugado a HRP. Se incubaron las placas a 37°C durante 60 minutos y se lavaron posteriormente 6 veces. Se añadieron a cada pocillo 200 µl de OPD/substrato (una tableta de OPD (Sigma, # Cat. P-8287) en 6 ml de tampón de substrato ELISA) y se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió una solución de parada de H₂SO₄ 4N a razón de 50 µl/pocillo. Se registraron las DO a 493 nm usando un lector espectrofotométrico de placas.

Se adaptó el ajuste de corte del ensayo a partir de HCV 3.0 ELISA, que es la DO de la media de los negativos más 0,6. Las excepciones del ensayo eran:

- (1) En "ELISA-1", el diluyente de muestras era del kit y contenía detergente Tween 20, mientras que en "ELISA-2" se substituyó el detergente por *N*-laurilsarcosina (NLS) y en "ELISA-3" se substituyó el detergente por *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO).
- (2) En "ELISA-1", se diluyó el anticuerpo monoclonal IgG murina anti-humana conjugado a HRP proporcionado en el kit a 1:3 antes de su uso, y en "ELISA-2" y "ELISA-3" se diluyó el anticuerpo conjugado proporcionado en el kit a 1:2 antes de su uso.

Tal como se muestra en la Tabla 1, tanto para los especímenes con depleción de anti-c22 como para los especímenes con depleción de anti-c33c, el Tween 20 (comúnmente utilizado en la detección de anticuerpos anti-VHC) y el LDAO dieron cada uno una mayor sensibilidad de ensayo, como reflejan las razones de señal a corte ("S/C"), que la NLS (típicamente utilizada en la detección de antígenos del VHC).

Ejemplo 2: Detección de anticuerpos anti-VHC (formato de ensayo en sándwich de Ag)

En el formato de ensayo en sándwich de Ag, se usaron antígenos marcados con biotina como conjugado. Los conjugados biotina-antígeno se unieron a anticuerpos anti-VHC humanos que estaban capturados sobre una fase sólida para formar un sándwich Ag-Ab-Ag. Se detectaron entonces los complejos en sándwich por estreptavidina conjugada a HRP en una incubación posterior.

Se revistieron placas de microtitulación COSTA™ de alta unión con 200 µl/pocillo de anticuerpos monoclonales C11-3 y C11-7 premezclados a razón de 2,2 µg/ml de cada uno de ellos y HCC5N-BSA a razón de 0,1 µg/ml en tampón fosfato 20 mM (pH 7,0). Se incubaron las placas a 25°C durante la noche. Se aspiraron las soluciones de revestimiento y se añadieron 200 µl/pocillo de rNS3(h) a razón de 2 µg/ml en PB (pH 7,0). Se incubaron las placas a 25°C durante la noche. Se lavaron entonces las placas una vez con tampón de lavado PBS/Tween, seguido de adición de 300 µl/pocillo de solución de bloqueo PBS/BSA (seroalbúmina bovina al 1% y sacarosa al 30% en PBS) durante 1 hora a 25°C. Se aspiraron las placas y se secaron durante la noche a 25°C con un 10% de humedad y se envolvieron con desecante.

La composición del diluyente de muestras era la misma que la usada en el Ejemplo 1, excepto por contener detergente Tween 20 en "ELISA-4", detergente *N*-laurilsarcosina (NLS) en "ELISA-5" y detergente *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO) en "ELISA-6". Se añadieron 100 µl de diluyente de muestras y 100 µl de muestra a cada pocillo. Se incubaron las muestras a 37°C durante 1 hora con agitación. Se lavaron entonces las placas 5 veces con PBS/Tween 20. Se añadieron 200 µl de biotina-rNS3(h) (o "rNS3(h)-b") a razón de 60 ng/ml o biotina-HCC5 (HCC5-b) a razón de 5 ng/ml a cada pocillo. Se diluyó la biotina-antígeno en diluyente de conjugado CD-1 (bloqueante de caseína en PBS, Pierce # Cat. 37528, suplementado con Tween 20 hasta el 0,05% y EDTA hasta 2 mM). Se mantuvo la incubación de la biotina-antígeno a 37°C durante 60 minutos con agitación. Se lavaron las placas 5 veces y se añadió HRP-estreptavidina (Jackson ImmunoResearch, # Cat. 016-030-084) 1:8.000 diluida en CD-1 a razón de 200 µl/pocillo. Se mantuvo la incubación de la HRP-estreptavidina a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron entonces las placas 6 veces, después de lo cual se añadieron a cada pocillo 200 µl de OPD/substrato. Se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añadió a cada pocillo una alícuota de 50 µl de solución de parada de H₂SO₄ 4N. Se registraron las DO a 493 nm usando un lector de placas espectrofotométrico. Se determinó el corte del ensayo como la DO de la media de los negativos más 0,300. En la Tabla 2 se muestran los resultados del ensayo. Los resultados muestran que, con el espécimen desprovisto de anti-c33c, tanto el Tween 20 como el LDAO proporcionaban una mayor sensibilidad de ensayo que la NLS. Los resultados también demuestran que el formato en sándwich de antígeno (Ag-Ab-Ag) es mejor que el formato indirecto (Ag-Ab-2º Ab).

Ejemplo 3: Detección del antígeno del núcleo del VHC

La detección del antígeno del núcleo del VHC mostrada en el Ejemplo 3 correspondía a un ELISA en sándwich de anticuerpo monoclonal-antígeno del núcleo del VHC-anticuerpo monoclonal. Se capturó el antígeno del núcleo del VHC expuesto del espécimen mediante dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo del VHC depositados en placas y se detectó mediante otros dos anticuerpos monoclonales anti-VHC marcados con HRP.

Excepto por el diluyente de muestras, los reactivos ELISA usados en el Ejemplo 3 eran básicamente del kit Ortho HCV Core Antigen ELISA. "ELISA-7" utilizaba el diluyente de muestras del Kit original, que contenía un 1,0% del detergente *N*-laurilsarcosina (NLS). Sin embargo, "ELISA-8" utilizaba un diluyente de muestras que contenía un 1,0% del detergente Tween 20 y "ELISA-9" utilizaba un diluyente de muestras que contenía un 1,0% del detergente *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO).

Se realizó el ELISA siguiendo el protocolo de HCV Core Antigen ELISA. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de diluyente de muestras y 100 µl de espécimen. Se incubó el espécimen a 37°C durante 90 minutos con agitación. Se

lavó la placa 5 veces con PBS/Tween 20 y se añadieron a cada pocillo los anticuerpos conjugados a razón de 200 µl. Se realizó la incubación de los conjugados a 37°C durante 30 minutos. Se lavó la placa 6 veces y se añadieron a cada pocillo 200 µl de OPD/substrato. Se incubó entonces la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió luego una solución de parada de H₂SO₄ 4N a razón de 50 µl/pocillo. Se registraron las DO a 493 nm usando un lector de placas espectrofotométrico. El ajuste del corte del ensayo era similar al HCV Core Antigen ELISA, es decir, la DO de la media de los negativos más 0,300.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del ensayo. Para los especímenes, tanto la NLS como el LDAO proporcionaban una mayor sensibilidad de ensayo que el Tween 20.

Ejemplo 4: Ensayo de combinación para antígeno del núcleo del VHC/anti-VHC

Se realizó un ELISA de combinación para antígeno del núcleo del VHC/anticuerpos anti-VHC en las mismas placas que las empleadas en el Ejemplo 2. Se revistieron las placas con anticuerpos monoclonales anti-VHC C11-3 y C11-7, HCC5-BSA y rNS3(h). El diluyente de muestras estaba compuesto por tampón fosfato 20 mM (pH 7,3), cloruro de sodio 0,5 M, EDTA 1 mM, 1% de detergente LDAO, 1% de BSA, 0,03% de extractos de levadura y 0,01% de superóxido dismutasa (SOD) desnaturalizada, 200 µg/ml de inmunoglobulina G (IgG) de ratón y 0,1% de 2-cloroacetamida. El conjugado de anticuerpo/antígeno estaba compuesto por anticuerpo monoclonal anti-VHC C11-14 marcado con HRP a razón de 4 µg/ml y anticuerpo monoclonal 12F11 marcado con HRP a razón de 4 µg/ml, HCC5-biotina a razón de 5 ng/ml y rNS3(h)-biotina a razón de 60 ng/ml, en un tampón constituido por tampón fosfato 10 mM (pH 7,3), cloruro de sodio 142 mM, cloruro de potasio 3 mM, 0,1% de detergente Tween 20, 1,5% de BSA, 20% de suero de ternera recién nacida inactivado por calor, 0,03% de ferricianuro de potasio, 100 µg/ml de inmunoglobulina G de ratón (monoclonal) y 0,1% de 2-cloroacetamida. El conjugado de estreptavidina marcado con HRP estaba compuesto por HRP-estreptavidina (Jackson ImmunoResearch, # Cat. 016-030-084) 1:8.000 diluida en CD-1 (bloqueante de caseína en PBS, Pierce # Cat. 37528, con adición de Tween 20 hasta el 0,05% y de EDTA hasta 2 mM).

El protocolo de ensayo era el mismo que el descrito en el Ejemplo 2. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de diluyente de muestras y 100 µl de espécimen. Se incubaron entonces las placas a 37°C durante 1 hora con agitación, seguido de lavado 5 veces con PBS/Tween 20. Se añadieron luego a cada pocillo 200 µl de mezcla de conjugado anticuerpo/antígeno. Se realizó la incubación del conjugado anticuerpo/antígeno a 37°C durante 60 minutos con agitación. Se lavaron entonces las placas 5 veces, se añadieron a continuación 200 µl/pocillo de HRP-estreptavidina y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron después las placas 6 veces, se añadieron 200 µl de OPD/substrato a cada pocillo y se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 50 µl/pocillo de solución de parada de H₂SO₄ 4N y se registraron las DO a 493 nm usando un lector de placas espectrofotométrico. Se fijó el corte del ensayo a 0,300.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de ensayo del ELISA de combinación de antígenos/anticuerpos del VHC en paneles de seroconversión del VHC BBI. En la Tabla 5 se muestran los resultados de ensayo del ELISA de combinación de antígenos/anticuerpos del VHC en paneles de seroconversión del VHC ZeptoMetrix. Puede verse que, en una etapa de infección temprana, la detección era negativa en el ensayo de detección de anticuerpos, mientras que la detección era positiva usando el ensayo de ARN del VHC, el ensayo de antígenos del VHC o el ensayo de combinación de antígenos-anticuerpos del VHC. Véase, por ejemplo, la Tabla 4, con "PHV907", días 4, 7 y 13 desde la primera sangría. Por otra parte, en una fase posterior de la infección (v.g., día 164 con "PHV907"), cuando la detección de antígeno se volvió negativa y se redujo la cantidad de ARN del VHC, se detectaron intensamente anticuerpos anti-VHC en el ensayo de detección de anticuerpos, y la razón S/C estaba también muy por encima de 1 en el ensayo de combinación de antígenos-anticuerpos. Estos resultados demuestran que el ensayo de combinación de antígenos-anticuerpos del VHC proporcionaba una ventana de detección más amplia que un ensayo basado en la detección sólo de antígeno del VHC o de anticuerpo anti-VHC.

Tabla - 1. Comparación de detergentes en el ensayo de anti-VHC de formato indirecto										
Ensayos ELISA y formato →				ELISA-1 Indirecto		ELISA-2 Indirecto		ELISA-3 Indirecto		
Detergente en el diluyente de muestras →				Tween 20 (0,25%)		NLS (0,67%)		LDAO (0,67%)		
Dilución de conjugado del kit				1:3		1:2		1:2		
				DO	S/C	DO	S/C	DO	S/C	
5	Plasma negativo				0,001		0,001		0,002	
10					0,002		0,002		0,001	
					0,002		0,001		0,001	
	Especímenes del VHC	Dilución	RIBA 3.0							
			c33c	c22p						
15	WHO Hu-a-c33c	1:25	2+	-	2,122	3,5	0,745	1,2	1,773	2,9
		1:50	2+	-	1,179	2,0	0,414	0,7	0,985	1,6
		1:100	1+	-	0,911	1,5	0,297	0,5	0,707	1,2
	41530822	1:200	+	-	0,608	1,0	0,230	0,4	0,547	0,9
		1:25	+/-	-	1,235	2,1	0,306	0,5	1,094	1,8
		1:50	+/-	-	0,686	1,1	0,170	0,3	0,608	1,0
20	41530832	1:100	+/-	-	0,441	0,7	0,089	0,1	0,212	0,4
		1:200	2+	-	0,808	1,3	0,322	0,5	0,765	1,3
		1:400	+	-	0,648	1,1	0,230	0,4	0,547	0,9
	41530883	1:200	+/-	-	0,325	0,5	0,084	0,1	0,201	0,3
		1:400	+	-	0,985	1,6	0,203	0,3	0,590	1,0
		1:800	+/-	-	0,547	0,9	0,113	0,2	0,268	0,4
25					0,276	0,5	0,053	0,1	0,127	0,2
	Especímenes con depleción de anti-c33c									
30	WHO Hu-a-c22	1:25	-	4+	1,346	2,2	1,146	1,9	1,678	2,8
		1:50	-	4+	1,165	1,9	0,895	1,5	1,439	2,4
		1:100	-	2+	0,772	1,3	0,420	0,7	0,675	1,1
	I-20	1:100	-	3+	0,896	1,5	0,538	0,9	0,865	1,4
		1:200	-	2+	0,410	0,7	0,230	0,4	0,370	0,6
	360650	1:100	-	3+	0,637	1,1	0,380	0,6	0,611	1,0
		1:200	-	2+	0,325	0,5	0,197	0,3	0,316	0,5
35		1:400	-	+	0,171	0,3	0,108	0,2	0,173	0,3
	corte →				0,602		0,601		0,601	

40

45

50

55

60

65

Tabla - 2. Comparación de detergentes en el ensayo de anti-VHC en formato de sándwich de Ag												
Ensayos ELISA y formato →												
Detergente en el diluyente de muestras →												
				ELISA-4 Sándwich de Ag Tween 20 (0,25%)		ELISA-5 Sándwich de Ag NLS (1%)		ELISA-6 Sándwich de Ag LDAO (1%)		Conjugado Ag-biotina		
				DO	S/C	DO	S/C	DO	S/C			
Plasma negativo				0,044		0,012		0,013		rNS3(h)-b a 60 ng/ml HCC5-b a 5 ng/ml		
				0,013		0,008		0,010				
				0,018		0,020		0,030				
				0,036		0,017		0,027				
Especímenes del VHC												
		Dilución	RIBA 3.0									
			c33c	c22p								
Especímenes con depleción de anti-c22		1:100	1+	-	2,997	>9	2,997	>9	2,997	>9		
	WHO Hu-	1:200	+/-	-	2,997	>9	2,997	>9	2,997	>9		
	a-c33c	1:400	+/-	-	1,567	4,8	1,922	6,4	1,446	4,8		
		1:800	-	-	0,470	1,4	0,754	2,5	0,427	1,4		
	41530822	1:100	+/-	-	0,560	1,9	1,720	5,7	0,580	1,9		
		1:200	-	-	0,284	0,9	0,724	2,4	0,236	0,8	rNS3(h)-b a 60 ng/ml	
	41530832	1:200	+/-	-	2,997	>9	2,997	>9	2,997	>9		
		1:400	+/-	-	1,418	4,7	2,538	8,5	1,984	6,6		
		1:800	+/-	-	0,232	0,8	0,720	2,4	0,360	1,2		
	41530883	1:200	+	-	2,800	9,3	2,997	>9	2,997	>9		
		1:400	+/-	-	0,510	1,7	1,560	5,2	0,838	2,8		
		1:800	-	-	0,168	0,6	0,612	2,0	0,294	1,0		
Corte →				0,329		0,310		0,312				
Especímenes con depleción de anti- c33c		1:200	-	2+	2,119	6,5	0,174	0,5	2,997	>9		
	WHO Hu-	1:400	-	1+	1,588	4,9	0,117	0,4	2,858	8,7		
	a-c22	1:800	-	+/-	1,122	3,4	0,066	0,2	1,909	5,8		
	I-20	1:200	-	2+	0,637	1,9	0,087	0,3	1,127	3,4		
		1:400	-	2+	0,343	1,0	0,050	0,2	0,610	1,9	HCC5-b a 5 ng/ml	
		1:800	-	+/-	0,185	0,6	0,046	0,1	0,310	0,9		
	360650	1:200	-	2+	1,659	5,1	0,137	0,4	2,086	6,4		
		1:400	-	2+	0,739	2,3	0,075	0,2	1,156	3,5		
		1:800	-	+/-	0,337	1,0	0,056	0,2	0,592	1,8		
	Corte →				0,327		0,319		0,329			

Tabla - 3. Comparación de detergentes en el ensayo del Ag del núcleo del VHC

Ensayos ELISA → Detergente en el DM →		ELISA-7 NLS (1,0%)		ELISA-8 Tween 20 (1,0%)		ELISA-9 LDAO (1,0%)	
		DO	S/C	DO	S/C	DO	S/C
Plasma negativo		0,010		0,014		0,011	
		0,010		0,017		0,008	
		0,008		0,013		0,009	
Dilución							
Lote 16, un pool de especímenes de plasma que fueron todos ellos caracterizados como anti-VHC (-), ARN del VHC (+) y Ag del núcleo del VHC (+)	neto	0,722	15	0,300	5,5	1,852	38
	1:1,5	1,075	22	0,189	3,5	1,220	25
	1:2,0	1,115	23	0,149	2,7	0,948	19
	1:3,0	0,802	16	0,103	1,9	0,621	13
	1:4,0	0,602	12	0,074	1,3	0,431	8,8
	1:5,0	0,490	9,9	0,064	1,2	0,335	6,8
	1:6,0	0,379	7,7	0,051	0,9	0,279	5,7
	1:8,0	0,271	5,5	0,041	0,7	0,199	4,1
	1:10	0,214	4,3	0,040	0,7	0,148	3,0
	1:16	0,155	3,1	0,026	0,5	0,104	1,0
	Dilución	X millones de UI/ml (copias/ml)					
9160834 @	1:5	7,28 (37,8)		0,178	3,2	1,121	23
36,4 x 10 ⁶ UI/ml	1:10	3,64 (18,9)		0,086	1,6	0,527	11
o 189 x 10 ⁶ copias/ml	1:20	1,82 (9,46)		0,047	0,9	0,251	5,1
	1:30	1,21 (6,31)		0,036	0,6	0,157	3,0
	1:40	0,91 (4,73)		0,028	0,5	0,116	2,4
corte →		0,049		0,055		0,049	

Tabla - 4. Ensayo de combinación de antígenos/anticuerpos VHC en paneles de seroconversión del VHC BBI

Paneles de seroconversión		Días desde la primera sangría	anti-VHC		ARN del VHC	Ag del VHC (núcleo del VHC)	Ensayo de combinación de Ag/Ab VHC		
ID	Sangría		RIBA 3.0	HCV 3.0			Kit de ensayo	Cantidad	Pos o (Neg)
			c22p	c33c	S/C				
<i>De la hoja de datos del panel</i>									
PHV907 genotipo 1b	1	0	-	-	0,0		>5x10 ⁵	pos	0,311 1,04
	2	4	-	-	0,0		>5x10 ⁵	pos	0,317 1,06
	3	7	-	-	0,0		>5x10 ⁵	pos	0,371 1,24
	4	13	1+	-	0,1		>5x10 ⁵	pos	0,437 1,46
	5	18	4+	+/-	0,4		>5x10 ⁵	pos	0,877 2,92
	6	21	4+	1+	1,0		>5x10 ⁵	pos	2,442 8,14
	7	164	4+	4+	4,4		4x10 ⁴	neg	>3 >10
PHV909 genotipo 3	s1	0	-	-	0,0		1x10 ⁴	pos	0,305 1,02
	2	28	1+	-	1,3		4x10 ⁴	pos	0,701 2,34
	3	30	2+	-	1,3		2x10 ⁴	pos	0,960 3,20
PHV910 genotipo 1b	1	0	-	-	0,0		>5x10 ⁵	pos	0,599 2,00
	2	4	-	-	0,0		>5x10 ⁵	pos	0,424 1,41
	3	8	3+	1+	3,0		>5x10 ⁵	pos	1,497 4,99
	4	11	4+	3+	6,7		>5x10 ⁵	pos	>3 >10
	5	15	4+	4+	8,0		>5x10 ⁵	pos	>3 >10
PHV913 genotipo 2b	1	0	-	-	0,0	ARN del VHC Roche Amplificador PCR (BBI) copias/ml	>5x10 ⁵	pos	0,310 1,03
	2	2	-	-	0,1		>5x10 ⁵	pos	0,330 1,10
	3	7	2+	-	1,5		>5x10 ⁵	pos	0,867 2,89
	4	9	2+	+/-	1,7		>5x10 ⁵	pos	1,256 4,19

5	PHV914 genotipo 2b	1	0	-	-	0,0	>5x10 ⁵	pos	0,292	0,97
		2	5	-	-	0,0	>5x10 ⁵	pos	0,366	1,22
		3	9	-	-	0,0	>5x10 ⁵	pos	0,307	1,02
		4	12	-	-	0,1	>5x10 ⁵	pos	0,325	1,08
		5	16	2+	-	1,2	>5x10 ⁵	pos	0,310	1,03
		6	19	2+	-	2,1	>5x10 ⁵	pos	0,323	1,08
		7	24	4+	+/-	4,5	>5x10 ⁵	pos	0,392	1,31
		8	30	4+	3+	6,8	>5x10 ⁵	pos	1,452	4,84
		9	33	4+	3+	7,6	>5x10 ⁵	pos	2,052	6,84
10	PHV916 genotipo 2b	1	0	-	-	0,0	3x10 ⁵	pos	0,127	0,42
		2	2	-	-	0,0	>5x10 ⁵	pos	0,297	0,99
		3	7	-	-	0,0	>5x10 ⁵	pos	0,375	1,25
		4	9	-	-	0,0	>5x10 ⁵	pos	0,483	1,61
		5	16	-	+/-	0,3	>5x10 ⁵	pos	0,314	1,05
		6	19	-	+/-	1,1	>5x10 ⁵	pos	0,607	2,02
		7	23	-	3+	2,7	4x10 ⁵	pos	0,861	2,87
		8	28	-	3+	3,7	2x10 ⁵	neg	1,051	3,50
15	PHV918 genotipo 1a	1	0	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,272	0,91
		2	2	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,544	1,81
		3	7	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,393	1,31
		4	9	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,660	2,20
		5	14	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,441	1,47
		6	16	+/-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,998	3,33
		7	24	3+	-	0,6	>8x10 ⁵	pos	0,368	1,23
		8	27	3+	1+	0,8	>8x10 ⁵	pos	0,627	2,09
20	PHV920 genotipo 1a	1	0	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,107	0,36
		2	5	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,891	2,97
		3	7	-	-	0,0	>8x10 ⁵	pos	0,304	1,01
		4	13	+/-	1+	0,5	>8x10 ⁵	pos	2,292	7,64
		5	16	1+	3+	3,1	>8x10 ⁵	pos	2,840	9,47
		6	20	1+	3+	3,6	3x10 ⁴	neg	1,911	6,37
		7	26	1+	3+	>5	8x10 ⁴	neg	1,637	5,46
		8	28	2+	4+	>5	2x10 ³	neg	1,533	5,11
		9	33	2+	4+	>5	BLD	neg	2,374	7,91
control de plasma negativo - 1									0,016	0,05
control de plasma negativo - 2									0,019	0,06
control de plasma negativo - 3									0,011	0,04

40

Tabla - 5. Ensayo de combinación de antígenos/anticuerpos VHC en paneles de seroconversión del VHC ZeptoMatrix											
Paneles de seroconversión		Días desde la primera sangría	anti-VHC			ARN del VHC	Ag del VHC (núcleo del VHC)	Ensayo de combinación de Ag/Ab VHC			
ID	Sangría		RIBA 3.0	HCV 3.0	S/C			Kit de ensayo	Cantidad	Pos o (Neg)	DO
<i>De la hoja de datos del panel</i>											
60	6212	1	0	-	-	0,00	CHIRON	1,88x10 ⁵	pos	0,086	0,29
		2	12	-	+/-	0,15	HCV	2,21x10 ⁵	neg	1,965	6,55
		3	14	-	+/-	0,30	RNA	<200.000	neg	2,503	8,34
		4	23	-	1+	1,49	copias/ml	2,27x10 ⁵	neg	>3	>10
		5	26	-	1+	1,87		2,03x10 ⁵	neg	>3	>10
		6	32	-	1+	2,37		<200.000	neg	>3	>10
		7	37	-	1+	2,46		3,91x10 ⁵	neg	>3	>10
		8	53	-	4+	4,13		4,66x10 ⁵	neg	>3	>10
		9	55	-	4+	4,13		3,57x10 ⁵	neg	>3	>10

65

ES 2 443 591 T3

5	6215	1	0	-	-	0,00	CHIRON HCV RNA (bDNA) (copias/ ml)	>120x10 ⁶	pos	0,898	2,99
		2	3	-	-	0,01		104x10 ⁶	pos	0,952	3,17
		3	10	-	-	0,02		58x10 ⁶	pos	0,456	1,52
		4	20	4+	+/-	4,66		48x10 ⁶	pos	2,321	7,74
10	6225	10	35	-	-	0,00	CHIRON bDNA (MEq/ml)	<0,2	neg	0,034	0,11
		11	39	-	-	0,00		<0,2	neg	0,021	0,07
		12	45	-	-	0,00		27,02	pos	0,266	0,89
		13	47	-	-	0,00		98,84	pos	0,678	2,26
		14	52	-	-	0,00		77,79	pos	0,627	2,09
		15	56	-	-	0,01		54,71	pos	0,545	1,82
		16	60	-	-	0,00		>120	pos	1,027	3,42
		17	72	-	-	0,07		9,37	pos	0,635	2,12
		18	77	-	1+	1,73		4,97	pos	1,380	4,60
19	79	-	1+	2,11	3,24	pos	1,400	4,67			
20	6229	1	0	-	-	0,1	CHIRON bDNA (MEq/ml)	52,19	pos	0,490	1,63
		2	3	-	-	0,1		55,83	pos	0,528	1,76
		3	7	-	-	0,1		55,53	pos	0,452	1,51
		4	10	-	-	0,1		94,76	pos	0,823	2,74
		5	18	-	-	0,53		31,88	pos	1,346	4,49
		6	21	-	+/-	1,06		69,85	pos	1,636	5,45
		7	25	+/-	1+	1,71		51,02	pos	1,594	5,31
		8	29	+/-	3+	4,07		43,89	pos	2,590	8,63
30	9041	1	0	-	-	0,00	CHIRON HCV RNA bDNA 2.0 (MEq/ml) * Un mega-	<0,2	neg	0,044	0,15
		2	24	-	-	0,01		15,78	pos	0,125	0,42
		3	27	-	-	0,01		63,72	pos	0,603	2,01
		4	31	-	-	0,01		>120	pos	1,106	3,69
		5	62	+/-	4+	7,30		72,27	pos	2,924	9,75
		6	64	+/-	4+	8,03		66,27	pos	>3	>10
		7	69	1+	4+	8,20		21,80	pos	>3	>10
		8	71	3+	4+	8,78		11,24	pos	>3	>10
35	9044	1	0	-	-	0,00	equiva- lente/ml (MEq/ml) es ≈ 1 millón de equiva- lentes del ARN del VHC	105,90	pos	0,652	2,17
		2	4	-	-	0,01		52,71	pos	0,496	1,65
		3	17	-	-	0,00		77,18	pos	0,722	2,41
		4	21	-	+/-	0,69		71,52	pos	1,089	3,63
		5	25	-	2+	3,70		72,82	pos	1,147	3,82
		6	29	-	3+	4,51		48,83	pos	0,855	2,85
40	9045	1	0	-	-	0,00	lentes del ARN del VHC	17,73	pos	0,361	1,20
		2	2	-	-	0,00		16,42	pos	0,321	1,07
		3	7	-	-	0,00		36,19	pos	0,395	1,32
		4	9	-	-	0,01		38,07	pos	0,557	1,86
		5	26	-	-	0,00		44,86	pos	0,389	1,30
		6	32	-	-	0,04		17,78	pos	0,302	1,01
		7	37	-	1+	2,61		18,36	pos	1,314	4,38
		8	41	-	2+	3,51		2,32	pos	1,043	3,48
50	9047	1	0	-	-	0,10	lentes del ARN del VHC	65,95	pos	0,474	1,58
		2	2	-	-	0,12		81,76	pos	0,517	1,72
		3	10	-	-	0,09		54,85	pos	0,368	1,23
		4	12	-	-	0,05		64,03	pos	0,501	1,67
		5	19	-	-	0,10		55,45	pos	0,346	1,15
		6	21	-	-	0,09		42,97	pos	0,334	1,11
		7	28	-	2+	1,51		9,13	pos	2,921	9,74
		8	30	-	4+	3,92		26,58	pos	2,992	9,97
		9	35	-	4+	7,36		22,77	pos	>3	>10
		10	37	+/-	4+	6,77		nd	pos	>3	>10
60	9054	7	52	-	-	0,00	lentes del ARN del VHC	<0,2	neg	0,040	0,13
		8	74	+/-	-	0,00		86,79	pos	0,555	1,85
		9	77	1+	+/-	0,14		86,75	pos	0,532	1,77
		10	82	2+	1+	3,16		59,14	pos	>3	>10

ES 2 443 591 T3

5	9058	1	0	+/-	-	0,07	90,58	pos	0,762	2,54	
		2	3	+/-	-	0,08	85,34	pos	0,764	2,55	
		3	7	+	+/-	0,15	37,64	pos	0,487	1,62	
		4	10	1+	1+	0,66	48,33	pos	0,930	3,10	
		5	14	2+	1+	3,16	29,46	pos	1,209	4,03	
control de plasma negativo - 1									0,016	0,05	
control de plasma negativo - 2									0,019	0,06	
10	control de plasma negativo - 3									0,011	0,04

LISTA DE SECUENCIAS

- 15 <110> Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.
 <120> Reactivos para ensayos de combinación de antígenos-anticuerpos para el VHC
 <130> P054678EP
 20 <150> US12/469.568
 <150> 20-05-2009
 <160> 3
 25 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 38
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido antigénico del VHC sintético "HCC5N"
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (37)..(37)
 <223> Nle
 40 <400> 1
 Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro
 1 5 10 15
 45 Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly
 20 25 30
 50 Pro Arg Leu Gly Xaa Cys
 35
 <210> 2
 <211> 38
 <212> PRT
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido antigénico del VHC sintético "HCC5-b"
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa es Lisina biotinilada
 65 <400> 2

ES 2 443 591 T3

Lys Thr Ivs Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro
 1 35 5 10 15
 5 Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly
 20 25 30
 Pro Arg Leu Gly Gly Xaa
 10
 <210> 3
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Proteína de fusión recombinante entre el marcador 6xHis y rNS3(h) del VHC
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(12)
 <223> Marcador 6xHis
 25
 <400> 3
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Pro Val Phe Thr
 1 5 10 15
 30 Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His
 20 25 30
 Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala
 35 35 40 45
 Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala
 50 55 60
 Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Val Asp
 65 70 75 80
 Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile
 85 90 95
 45 Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly
 100 105 110
 50 Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala
 115 120 125
 Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala
 130 135 140
 55 Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val
 145 150 155 160
 Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly
 165 170 175
 60 Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly
 180 185 190
 65 Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu

ES 2 443 591 T3

	195	200	205
5	Ala Thr Lys Leu Val Ala	Leu Gly Ile Asn Ala	Val Ala Tyr Tyr Arg
	210	215	220
	Gly Leu Asp Val Ser Val	Ile Pro Ser Ser Gly Asp Val Val Val	Val
	225	230	235
10	Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Phe Thr	Gly Asp Phe Asp Ser	Val
	245	250	255
15	Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp		
	260	265	270
	Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser		
	275	280	285
20	Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr		
	290	295	300
	Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser		
	305	310	315
25	Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr		
	325	330	335
30	Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly		
	340	345	350
	Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr		
	355	360	365
35	Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser		
	370	375	380
40	Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala		
	385	390	395
	Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu		
	405	410	415
45	Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg		
	420	425	430
	Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys		
	435	440	445
50	Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr		
	450	455	460
55			
60			
65			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inmunoensayo para detectar simultáneamente antígenos del VHC y anticuerpos para el VHC en una muestra, consistente en:
- 10 disponer de un detergente no iónico que incluye óxido de *N*-alquil-*N,N*-dimetilamina, un primer par de un antígeno de captura y un antígeno de detección y un primer par de un anticuerpo de captura y un anticuerpo conjugado, donde dicho antígeno de captura y dicho antígeno de detección comprenden ambos un primer fragmento peptídico de una
- 15 segunda proteína del VHC, dicho anticuerpo de captura y dicho anticuerpo conjugado se unen específicamente a una segunda proteína del VHC y dicho antígeno de detección y dicho anticuerpo conjugado comprenden un medio generador de señal, que es el mismo en ambos;
- 20 poner en contacto dicha muestra en presencia de dicho detergente con dicho antígeno de captura, dicho antígeno de detección, dicho anticuerpo de captura y dicho anticuerpo conjugado, para formar un complejo en sándwich entre dicho antígeno de captura, dicho antígeno de detección y un anticuerpo anti-VHC presente en dicha muestra y un complejo entre dicho anticuerpo de captura, dicho anticuerpo conjugado y un antígeno del VHC presente en dicha muestra, y
- medir una señal generada por dicho medio generador de señal como resultado de la formación de dichos complejos, detectando así simultáneamente antígenos del VHC y anticuerpos para el VHC en dicha muestra.
- 25 2. Un kit para detectar simultáneamente antígenos del VHC y anticuerpos para el VHC en una muestra, que comprende un detergente no iónico que incluye óxido de *N*-alquil-*N,N*-dimetilamina, un primer par de un antígeno de captura y un antígeno de detección y un primer par de un anticuerpo de captura y un anticuerpo conjugado, donde dicho antígeno de captura y dicho antígeno de detección comprenden un primer fragmento peptídico de una primera
- 30 proteína del VHC, dicho anticuerpo de captura y dicho anticuerpo conjugado se unen específicamente a una segunda proteína del VHC y dicho antígeno de detección y dicho anticuerpo conjugado comprenden un medio generador de señal, que es el mismo en ambos.
3. El inmunoensayo de la reivindicación 1 o el kit de la reivindicación 2, donde dicho óxido de *N*-alquil-*N,N*-dimetilamina se caracteriza por la fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{O}^-$, donde *n* está dentro del rango de 9 a 13.
- 35 4. El inmunoensayo o el kit de la reivindicación 3, donde dicho óxido de *N*-alquil-*N,N*-dimetilamina es *N*-óxido de laurildimetilamina (LDAO).
5. El inmunoensayo de la reivindicación 1 o el kit de la reivindicación 2, donde dichas primera proteína del VHC y segunda proteína del VHC son independientemente seleccionadas entre el grupo consistente en el antígeno del núcleo, E1, E2, NS2, NS3, NS4 y NS5.
- 40 6. El inmunoensayo de la reivindicación 1 o el kit de la reivindicación 2, donde dicha primera proteína del VHC y dicha segunda proteína del VHC son las mismas y dicho anticuerpo de captura y dicho anticuerpo conjugado se unen a una región de dicha segunda proteína del VHC fuera de dicho primer fragmento peptídico.
- 45 7. El inmunoensayo o el kit de la reivindicación 6, donde dicha primera proteína del VHC y dicha segunda proteína del VHC son ambas el antígeno del núcleo del VHC.
8. El inmunoensayo de la reivindicación 1, donde se dispone de un segundo par de un antígeno de captura y un antígeno de detección, donde dicho antígeno de captura y dicho antígeno de detección del segundo par comprenden ambos un segundo fragmento peptídico de una proteína del VHC, donde dicho segundo fragmento peptídico es diferente de dicho primer fragmento peptídico.
- 50 9. El kit de la reivindicación 2, que además incluye un segundo par de un antígeno de captura y un antígeno de detección, donde dicho antígeno de captura y dicho antígeno de detección del segundo par comprenden un segundo fragmento peptídico de una proteína del VHC, donde dicho segundo fragmento peptídico es diferente de dicho primer fragmento peptídico.
- 55 10. El inmunoensayo de la reivindicación 8 o el kit de la reivindicación 9, donde dicho primer fragmento peptídico y dicho segundo fragmento peptídico derivan de diferentes proteínas del VHC.
- 60 11. El inmunoensayo o el kit de la reivindicación 10, donde al menos uno de dicho primer fragmento peptídico o dicho segundo fragmento peptídico es un fragmento del antígeno del núcleo del VHC.
12. El inmunoensayo de la reivindicación 1 o el kit de la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo de captura en dicho primer par comprende dos o más anticuerpos.
- 65 13. El inmunoensayo de la reivindicación 1 o el kit de la reivindicación 2, donde se dispone de un segundo par de un anticuerpo de captura y un anticuerpo conjugado, donde dicho anticuerpo de captura y dicho anticuerpo conjugado

en dicho segundo par se unen específicamente a dicha segunda proteína del VHC o a una proteína del VHC diferente.

5 14. El inmunoensayo de la reivindicación 1 o el kit de la reivindicación 2, donde dicho antígeno de captura y dicho anticuerpo de captura están unidos a una fase sólida.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65