

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 247**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 08799234 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2210101**

54 Título: **Procedimiento de detección de sangre oculta**

30 Prioridad:

30.10.2007 US 978820

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

10.04.2014

73 Titular/es:

**WAN, JOHN (50.0%)
1713 Virginia Road
San Marino, CA 91108, US y
WAN, ZHIJING (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WAN, JOHN y
WAN, ZHIJING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 454 247 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de sangre oculta

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a la detección de sangre oculta de muestras del tracto gastrointestinal (GI). La presente invención proporciona un procedimiento de detección simultánea de hemoglobina y transferrina usando muestras de kcal. El procedimiento de la presente invención proporciona una base para el diagnóstico diferencial del sangrado del tracto GI superior frente al tracto GI inferior.

Antecedentes de la invención

10 La sangre oculta en heces ("FOB") es un buen indicador para monitorizar el sangrado del sistema gastrointestinal (GI). Ya que pueden ser necesarios varios años para que algunos pólipos en el colon se transformen en cáncer colorrectal, la detección de sangrado por pólipos de colon es una forma eficaz para detectar el cáncer colorrectal en una etapa temprana. La implementación de un procedimiento de detección de sangre oculta en las muestras de heces de adultos de 50 años o más ha reducido la incidencia del cáncer colorrectal en un 20% y la mortalidad en un 30%.

15 Las pruebas de FOB disponibles en la actualidad incluyen una prueba química que detecta metabolitos de hemoglobina en las muestras de heces. La prueba emplea un sustrato oxidable (tal como guayacol), que produce un producto coloreado en presencia de peróxido y hemoglobina. Como la mayoría de las moléculas hemo animales, los ingredientes vegetales y las vitaminas comunes también pueden catalizar la reacción de peróxido de hidrógeno, el control de la dieta es esencial para la especificidad de este tipo de prueba química. Un control de la dieta estricta
20 plantea un serio problema el cumplimiento del paciente. De media no es inusual una tasa de cumplimiento inferior al 10%. Además, las pruebas químicas, en general, tienen una sensibilidad limitada. Por ejemplo, una prueba de FOB utilizando guayacol como sustrato tiene una sensibilidad de la prueba de 50 µg/ml, con una versión mejorada que tiene una sensibilidad de la prueba de 20 µg/ml.

25 Se ha desarrollado un inmunoensayo de tipo sándwich para la hemoglobina, que proporciona una mejor sensibilidad y especificidad de la prueba en comparación con las pruebas químicas. La necesidad de control de la dieta también se elimina para dicho inmunoensayo.

30 La hemoglobina es una proteína lábil; se degrada rápidamente en el sistema GI humano. La hemoglobina también es susceptible a la degradación durante el transporte y almacenamiento después de recoger las muestras de heces. Todos estos problemas de degradación de la muestra afectan a la precisión de la prueba de las pruebas de hemoglobina.

35 La transferrina es otro biomarcador para detectar sangre oculta en heces. En sangre humana normal, las concentraciones de transferrina y hemoglobina son de 3 mg / ml y 150 mg / ml, respectivamente. Por otro lado, la proporción entre hemoglobina y transferrina en muestras fecales es de aproximadamente 5, que es mucho menor que la proporción (aproximadamente 50) en la sangre. Esta observación indica que la transferrina es aproximadamente 10 veces más estable que la hemoglobina en el tracto GI. Se ha informado de que ciertas enfermedades pueden afectar a los niveles de transferrina en la sangre y las muestras de heces en la medida en que una prueba FOB basada en la transferrina sola puede producir resultados negativos falsos. Una combinación de pruebas para detectar tanto hemoglobina como transferrina puede mejorar la sensibilidad de la prueba sin sacrificar la especificidad de la prueba.

40 Otro de los retos para el desarrollo de un ensayo FOB es que muy pocos analizadores automatizados actualmente en el mercado pueden manejar muestras fecales. Por lo tanto, es deseable y se requiere una prueba rápida FOB en el sitio.

El documento EP1256802 describe una prueba de sangre oculta en heces en la que la hemoglobina y / o la transferrina se utilizan como marcadores de sangre oculta en heces.

45 Chiang CH et al. "A Comparative Study of Three Fecal Occult Blood Tests in Upper Gastrointestinal Bleeding". Kaohsiung J Med Sci May 2006;22:223-227 describe un estudio comparativo de evaluación de las características de rendimiento de tres pruebas de sangre oculta diferentes (la prueba de o-toluidina; la prueba OC-Hemodia, y la prueba de sangre oculta inmunocromatográfica Quick Chaser) en los casos de hemorragia del tracto gastrointestinal superior.

50 Miyoshi H et al. "Immunological Determination of Fecal Hemoglobin and Transferrin Levels: A Comparison with Other Fecal Occult Blood Tests", American Journal of Gastroenterology 1992; 87:67-73 describe una comparación de una prueba de sangre oculta en heces que comprende la detección de hemoglobina y transferrina como con otra prueba de sangre oculta en heces (FECA-EIA) y dos pruebas químicas (guayacol y Hemocult) en tres grupos de pacientes que comprenden un grupo de control, pacientes con cáncer de colon y pacientes con pólipos.

Uchida K et al. "Immunochemical detection of human blood in feces". Clinica Chimica Acta 1990;189:267-274 describe una prueba inmunoquímica de sangre oculta en heces utilizando un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas de la hemoglobina y la transferrina humanas simultáneamente.

5 Miyoshi H et al, "Clinical study of a new fecal occult blood test using a combination assay of hemoglobin and transferrin", Gastroenterologia Japonica 1991;28:151-156 describe un estudio sobre la aplicabilidad de una prueba simultánea de sangre oculta en heces con hemoglobina y transferrina.

Lee EW et al, "Differential Diagnosis of Gastrointestinal Bleeding", Techniques in Vascular and Interventional Radiology 2005;7:112-122 es una revisión de las muchas causas de sangrado gastrointestinal y de las estrategias para la prestación de un diagnóstico específico.

10 **Sumario de la invención**

Como se describe en la presente memoria con referencia a las reivindicaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de diagnóstico diferencial de sangrado del tracto gastrointestinal superior en comparación con el tracto GI inferior, que comprende la detección de transferrina y hemoglobina en una muestra de heces utilizando un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, y la comparación de la cantidades de transferrina y hemoglobina detectadas con los respectivos valores predeterminados de la transferrina y hemoglobina, en el que el resultado de la detección es indicativa de hemorragia en el tracto GI inferior cuando la cantidad de transferrina está por encima de un valor predeterminado para la transferrina y la cantidad de hemoglobina está también por encima de un valor predeterminado para hemoglobina, y en el que el resultado de la detección es indicativo de sangrado del tracto gastrointestinal superior cuando la cantidad de transferrina está por encima de un valor predeterminado para la transferrina y la cantidad de hemoglobina está por debajo de un valor predeterminado para la hemoglobina, con lo que se realiza un diagnóstico diferencial de sangrado en el tracto gastrointestinal superior en comparación con el tracto gastrointestinal inferior.

25 En una forma de realización, dicho dispositivo comprende una tira de prueba que comprende: un sitio de la muestra para la aplicación de una muestra GI; un sitio de conjugado corriente abajo de dicho sitio de la muestra, en el que un anticuerpo anti-transferrina marcado y un anticuerpo anti-hemoglobina marcado se depositan en dicho sitio conjugado; una zona de prueba corriente abajo de dicho sitio de conjugado, en el que dicha zona de prueba comprende dos sitios separados, uno de los cuales se inmoviliza con un anticuerpo anti-transferrina, y el otro está marcado inmovilizado con un anticuerpo anti-hemoglobina, y un sitio de control en el que un anticuerpo de control se inmoviliza en el mismo.

30 En otra forma de realización, dicho dispositivo comprende dos tiras de prueba, en la que una primera tira comprende: un sitio de la muestra para la aplicación de una muestra GI; un sitio conjugado corriente abajo del sitio de la muestra, en el que un anticuerpo anti-transferrina marcado se deposita en dicho sitio conjugado; una zona de prueba corriente abajo de dicho sitio de conjugado, en el que dicha zona de ensayo comprende un sitio de prueba en el que un anticuerpo anti-transferrina se inmoviliza; un sitio de control en el que un anticuerpo control se inmoviliza; y en el que una segunda tira comprende: un sitio de la muestra para la aplicación de una muestra GI; un sitio conjugado corriente abajo del sitio de la muestra, en el que un anticuerpo anti-hemoglobina marcado se deposita en dicho sitio conjugado; una zona de prueba corriente abajo de dicho sitio de conjugado, en el que dicha zona de ensayo comprende un sitio de prueba en el que un anticuerpo anti-hemoglobina se inmoviliza; un sitio de control en el que un anticuerpo control se inmoviliza.

40 En un aspecto de la invención, la tira reactiva puede comprender una membrana de prueba hecha de nitrocelulosa.

En otro aspecto de la invención, dicho anticuerpo anti-transferrina marcado y dicho anticuerpo anti-hemoglobina marcado son ambos anticuerpos conjugados con partículas de oro.

Una forma de realización adicional de la invención comprende el uso de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral en cualquiera de los procedimientos de la invención.

45 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 es un dispositivo de recolección de muestra fecal. El dispositivo contiene un pequeño tapón de rosca, una tapa grande con una varilla y un vial con tampón de almacenamiento. Un usuario desenroscará la tapa grande con el cepillo del vial, punzando una muestra de heces múltiples veces en diferentes lugares; insertará el cepillo de nuevo en el vial con el tampón de almacenamiento y apretará la rosca. La materia fecal recogida en el cepillo se resuspenderá después en tampón de almacenamiento y quedará lista para la prueba. Cuando el técnico que va a realizar la prueba recibe el vial, solo tendrá que desenroscar la tapa pequeña y exprimir la solución de la muestra directamente sobre el dispositivo de prueba.

La Figura 2 es una vista superior de la membrana de ensayo para un inmunoensayo de tipo sándwich de combinación para la transferrina y hemoglobina. La tira de prueba incluye una almohadilla de absorción (1), membrana de nitrocelulosa (2), una línea de control (3), dos líneas de prueba de transferrina y hemoglobina, respectivamente (4), una línea marcada para el nivel máximo de líquido (8) y una almohadilla para la muestra (6).

La Figura 3 es una sección transversal de la misma tira cuando el punto 7 es un soporte de plástico y el punto 5 es una almohadilla de conjugado anticuerpo-oro debajo de una etiqueta.

La Figura 4 ilustra tres versiones posibles para un resultado positivo de la presencia de sangre en la muestra fecal.

5 **La figura 5** ilustra un resultado negativo con la prueba combinada.

La figura 6 muestra que, en ausencia de una línea de control de color del resultado de la prueba no es válido.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona un procedimiento de inmunoensayo de tipo sándwich y un dispositivo que puede detectar el sangrado de todo el sistema GI y puede apoyar un diagnóstico diferencial del sangrado del tracto GI superior frente al sangrado del tracto GI inferior. El inmunoensayo implica la detección simultánea de hemoglobina y transferrina. El inmunoensayo puede utilizar muestras GI, así como muestras de fluidos corporales que se sospecha que contienen sangre oculta.

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de la diferencia en estabilidad entre la transferrina y la hemoglobina como marcadores de sangre oculta. En la mayoría de los casos de sangrado en el tracto GI superior, la hemoglobina es completamente destruida por los ácidos gástricos y proteasas del estómago, el intestino y las bacterias. La transferrina, por otro lado, puede sobrevivir al paso a través del tracto GI. En las pruebas realizadas que conducen a la presente invención, se ha encontrado que en los pacientes con un diagnóstico clínico de un trastorno del tracto GI superior, la transferrina dio positivo y la hemoglobina dio negativo en muestras fecales, así como en las muestras de vómito y de líquido recogido en el tracto GI superior. Adicionalmente, se ha encontrado
20 que en los pacientes con un diagnóstico clínico de un trastorno GI inferior en donde la hemoglobina dio positivo en las muestras de heces, la transferrina también dio positivo.

25 En consecuencia, la solicitud proporciona un procedimiento para la detección de transferrina en muestras del tracto GI superior para ayudar en el diagnóstico de sangrado del tracto gastrointestinal superior. La presente invención proporciona un procedimiento para la detección simultánea de hemoglobina y transferrina en muestras fecales para ayudar en el diagnóstico de sangrado de todo el tracto gastrointestinal, y para diferenciar la hemorragia en el tracto gastrointestinal superior del sangrado en el tracto GI inferior. Se proporcionan dispositivos de ensayo para realizar los procedimientos de la presente invención.

30 El término "tracto GI superior" se refiere a la parte superior del tracto GI e incluye la boca, la faringe, el esófago, el estómago y duodeno. Por otra parte, el "tracto GI inferior" se refiere a la porción inferior del tracto GI y consta de los intestinos, el colon, el recto y el ano. Aunque aplicable al diagnóstico de sangrado de cualquier parte del tracto GI, el procedimiento actualmente reivindicado es particularmente útil para el diagnóstico de sangrado del tracto GI superior, mientras que en la actualidad no existe una prueba basada en la tira-fecal fiable disponible en la clínica.

35 El término "muestra GI" se refiere a una muestra o colección de materiales sólidos o líquidos liberados o secretados en el tracto GI, tales como heces y vómitos (una muestra del tracto GI superior), así como materiales sólidos o líquidos recogidos en el tracto gastrointestinal, tales como materiales gástricos recuperados Del estómago (también una muestra del tracto GI superior). Las materias primas recogidas se suspendieron típicamente o se diluyen en un tampón (tales como soluciones salinas) antes de su uso en un inmunoensayo.

40 Por "muestra fecal" se entiende una muestra recogida después de la defecación, que normalmente se mezcla posteriormente con una solución, que es adecuada para su uso en un inmunoensayo.

45 El término "diagnóstico" o "diagnosticar" debe entenderse en el sentido de la determinación de la probabilidad de que el sangrado esté asociado con el tracto GI superior o inferior. Por ejemplo, cuando la transferrina da positivo en una muestra fecal, mientras que la hemoglobina da negativo, es probable que el sangrado sea en el tracto GI superior. Cuando la hemoglobina y la transferrina dan "positivo" en una muestra fecal, es probable que el sangrado sea en el tracto GI inferior. El diagnóstico también se puede establecer sobre la base de la proporción relativa entre hemoglobina y transferrina en una muestra fecal, cuando mayor es la proporción (o cuando más cercana está la proporción a la proporción en sangre), mayor es la probabilidad de que el sujeto de ensayo sufra sangrado del tracto GI inferior. Por el contrario, cuanto menor es la proporción, más probable es que el sujeto de ensayo sufra sangrado del tracto gastrointestinal superior.

50 Los términos "positivo" y "negativo" se refieren a los valores de un analito de prueba por encima y por debajo de un valor predeterminado (concentración base o umbral, respectivamente. Los términos también se refieren a la presencia y ausencia, respectivamente, de una señal detectable o visible.

55 El "valor predeterminado" para un analito se refiere a la concentración base o umbral de un analito en individuos normales, y si el valor del analito está significativamente por encima de dicho valor predeterminado, es indicativo de anomalía, tal como sangrado. El valor predeterminado para un analito puede variar dependiendo del formato del ensayo, y los reactivos específicos empleados en el ensayo (por ejemplo, los anticuerpos particulares utilizados),

pero los pueden determinar y establecer los expertos en la técnica mediante la evaluación de la concentración del analito en individuos normales relativos a muestras de control que contienen cantidades conocidas del analito.

La hemoglobina y la transferrina en muestras de GI se pueden detectar mediante una variedad de inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos para hemoglobina y transferrina.

- 5 Por "anticuerpo" se entiende un anticuerpo monoclonal o policlonal. Ambas moléculas de anticuerpo de longitud completa y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos de larga duración pueden usarse.

En una realización específica, la detección se consigue mediante el empleo de un inmunoensayo de tipo sándwich, que implica el uso de un par de anticuerpos específicos para el analito a detectar. Los anticuerpos en el par son complementarios entre sí, es decir, los anticuerpos se unen a diferentes epítomos del analito y permite la formación del complejo de sándwich: anticuerpo 1-analito-anticuerpo 2. Típicamente, un anticuerpo del par de anticuerpos se inmoviliza sobre un material sólido (también referido como "anticuerpo de captura"), por ejemplo, en una membrana de nitrocelulosa, una placa de microtitulación, o perlas, mientras que el otro anticuerpo del par se conjuga con una etiqueta o un generador de señal. Para realizar el ensayo, una muestra que contiene el analito se mezcla con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción, y la mezcla de reacción se aplica a continuación al material sólido, permitiendo el anticuerpo de captura para la captura de complejo formado entre el analito y conjugado de anticuerpo. Alternativamente, una muestra que contiene el analito se aplica al material sólido y es capturado por el anticuerpo de captura unido al material sólido. A continuación se añade un anticuerpo conjugado para formar un complejo sándwich entre el anticuerpo de captura, el analito y el anticuerpo conjugado. Los materiales no unidos se eliminan mediante lavado y se desarrolla una señal y se lee, ya sea visual o instrumentalmente.

De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo se puede conjugar a un "marcador", "generador de señal" o "elemento de generación de señal" (por lo tanto, también referido como un "anticuerpo marcado"), que se refiere a una entidad que puede incorporar una serie de diferentes formas: enzimas y sus efectos resultantes sobre un sustrato, partículas metálicas coloidales, y el látex con el tinte incorporado, y partículas de colorante. Una enzima puede reaccionar sobre un sustrato para producir un producto que sea sensible, por ejemplo, por el color de la absorción (por ejemplo, ultravioleta, visible, infrarrojo), o por fluorescencia.

Las partículas metálicas se pueden emplear como generador de señal, que puede ser de platino, oro, plata, selenio, o de cobre o de cualquier otro de los compuestos metálicos que exhiben colores característicos. Las partículas de metal adecuados para uso en la presente invención se pueden preparar por procedimientos convencionales. Por ejemplo, la preparación de partículas de sol de oro se describe en Frens, Naturaleza 241: 20-22 (1973). Además, las partículas de metal pueden ser compuestos de metal o de metal o núcleos poliméricos recubiertos con metales o compuestos metálicos, como se describe en la patente de EE.UU. nº 4,313,734.

Las partículas de metal pueden ser partículas de oro de un tamaño en el intervalo de 5 nm a 100 nm, preferiblemente en el intervalo de 8 nm a 60 nm, y más preferiblemente en el intervalo de 10 a 40 nm.

- 35 Un anticuerpo deseado puede estar acoplado a partículas de metal usando técnicas convencionales, incluyendo, entre otros, acoplamiento covalente e unión hidrófoba. Además, el anticuerpo puede conjugarse con las partículas utilizando un enlace biotina / estreptoavidina.

Además, otras partículas en fase sólida adecuados para su uso en la producción de partículas conjugadas con anticuerpos incluyen, por ejemplo, partículas de látex de color, partículas de negro de carbono y tintes.

- 40 La detección de la hemoglobina y transferrina se logra mediante el empleo de un inmunoensayo de flujo lateral. Un dispositivo que ilustra el funcionamiento de un ensayo de este tipo se muestra en las Figuras 2-3.

El dispositivo para la prueba de inmunoensayo de flujo lateral incluye generalmente una tira de prueba que tiene un soporte de apoyo 7, que puede ser de plástico, cartón, o cualquier otro material rígido, y preferiblemente hecho de un material plástico. Encima del soporte de respaldo 7, hay una membrana de prueba 2, preferentemente hecha de una membrana de nitrocelulosa, que puede estar fijada al soporte 7. En la superficie superior de la membrana de prueba 2 están las zonas a las que se fijan los reactivos apropiados, incluyendo un área de prueba 4 que comprende dos sitios de ensayo por separado, con un anticuerpo anti-transferrina inmovilizada a un sitio, y un anticuerpo anti-hemoglobina inmovilizada a el otro sitio. La tira de ensayo también contiene una zona control 3 que tiene un anticuerpo control inmovilizado.

- 50 La tira de ensayo también contiene un sitio de la muestra para la aplicación de una muestra diluida a la tira de prueba, y un sitio de conjugado corriente abajo del sitio de la muestra. En general, una almohadilla de muestra absorbente 6 se coloca en el sitio de la muestra, y se pone en contacto con una almohadilla de conjugado 5 en el sitio de conjugado. La almohadilla de conjugado normalmente se coloca en la parte superior de y en contacto directo con una porción de extremo de la membrana de prueba 2, y contiene un anticuerpo anti-transferrina conjugado con un elemento de generación de señal y un anticuerpo anti-hemoglobina también conjugado con un elemento de generación de señal. En el otro extremo de la membrana de prueba 2 y en la parte superior de la membrana de prueba se coloca una almohadilla de absorción 1. Cuando se aplica una muestra GI a la almohadilla

de muestra 6, la muestra migrará hacia la almohadilla de absorción 1 y se transferirá a la membrana de prueba 2.

El sitio de conjugado es una almohadilla que contiene partículas de oro conjugadas con un anticuerpo antitransferrina y partículas de oro conjugadas con un anticuerpo anti-hemoglobina. Las partículas de oro conjugadas con un anticuerpo pueden prepararse como se ha descrito anteriormente, y son, preferiblemente, de un tamaño en el intervalo de 5 nm a 100 nm, más preferiblemente en el intervalo de 8 nm a 60 nm, y aún más preferiblemente en el intervalo de 10 a 40 nm.

Como se describió anteriormente, otros metales (tales como platino, plata, selenio, y cobre) también se pueden utilizar para producir partículas metálicas conjugados con un anticuerpo. Además, otras partículas en fase sólida adecuados para su uso en la producción de partículas conjugadas con anticuerpos incluyen, por ejemplo, partículas de látex de color, partículas de negro de carbono y tintes.

Los conjugados de anticuerpos de oro se depositan y se secan en una almohadilla absorbente 5, que se coloca corriente abajo de la almohadilla de muestra 6 donde se aplica la muestra. Alternativamente partículas de oro conjugadas con un anticuerpo deseado se secan y se depositan directamente en el extremo de la membrana de prueba 2 adyacente y corriente abajo de la almohadilla de muestra 6.

El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral se ilustra en las figuras 2-3 también puede incluir un estuche, en el que se coloca la tira de prueba. El estuche puede tomar una serie de formas diferentes que permitan la aplicación de la muestra a la almohadilla de muestra, permitir que la muestra migre a lo largo de la membrana de prueba por flujo lateral, y permitir la visualización de los resultados que se producen en las zonas de ensayo y de control.

Las figuras 2-5 ilustran el montaje de una tira de ensayo para una detección simultánea de la transferrina y la hemoglobina basada en inmunoensayos de tipo sándwich. Una muestra GI se aplica sobre la almohadilla de muestra 6, y el líquido en la muestra migra por acción capilar hacia la almohadilla de absorción 1. Cuando la muestra líquida llega a la almohadilla de conjugado de oro 5, el conjugado anti-hemoglobina-oro y el conjugado anti-hemoglobina-oro dentro de la almohadilla de conjugado de oro 5 se vuelven a suspender en el líquido, y los complejos resultantes, es decir, oro-anti-transferrina- transferrina y oro-anti-hemoglobina hemoglobina, para luego pasar a la membrana 2. Cuando la muestra líquida que contiene los complejos alcanza la zona de ensayo 4, que reaccionará con los anticuerpos anti-transferrina y anti-hemoglobina inmovilizados en su respectiva línea de prueba. En la ausencia de un analito especificado, no habrá formación de un complejo de sándwich, es decir, el anticuerpo conjugado con oro-analito-anticuerpo - anticuerpo inmovilizado, y la zona de línea de prueba 4 permanecerá incolora como se muestra en la **figura 5**. En presencia del analito, se formará el complejo sándwich en sus líneas de prueba específicas como se ilustra en **Figura 4**. Cuando el conjugado anticuerpo-oro, que siempre está en exceso de los antígenos (transferrina y hemoglobina) presentes en la muestra, se mueve hacia abajo de la membrana y alcanza la línea de control 3, la IgG anti-ratón de cabra inmovilizada reaccionará con el conjugado anticuerpo-oro para formar una línea de color en la zona de control 3. La zona de control sirve como un indicador para asegurar el movimiento de líquido del dispositivo. La ausencia de una línea de control de color como se muestra en **la figura 6** indica una prueba fallida.

Cabe señalar que **las figuras 2-5** no son más que ilustraciones de un dispositivo de prueba para una detección simultánea de transferrina y hemoglobina, y no están destinados a limitar la presente invención. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente que los dos sitios dentro de la zona de ensayo 4 también se pueden colocar por separado (por ejemplo, yuxtapuestos) en la misma posición a lo largo de la dirección de flujo lateral. Además, el dispositivo de prueba se puede fabricar para contener dos tiras separadas de ensayo, una para la prueba de hemoglobina (incluyendo una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugado de oro, un área de prueba que contiene sólo los anticuerpos anti-hemoglobina y un área de control), y la otra de transferrina pruebas (incluyendo una almohadilla de muestra, un cojín dorado conjugado, un área de prueba que contiene sólo los anticuerpos anti-transferrina y una zona de control). Con un dispositivo de este tipo, un usuario también puede tener la opción de aplicar la muestra a una sola de las dos tiras de prueba, dependiendo de la necesidad y las circunstancias para la prueba.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse de ningún modo como que imparten limitaciones del alcance de la misma. Los términos y expresiones que se han empleado en la presente divulgación se usan como términos de descripción y no como limitación y no hay intención de que al usar dichos términos y expresiones se excluya cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas. Debe entenderse que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos monoclonales contra hemoglobina y transferrina

Ratones BALB / c fueron inmunizados con la hemoglobina humana purificada durante tres meses para inducir la producción de anticuerpos. Después de que el título de antisuero alcanzó un nivel deseado, se sacrificaron los ratones. Se usaron esplenocitos aislados para la fusión de hibridoma con células de la línea SP20. Un par de líneas de células de hibridoma, Hb10E11G12 y Hb2H11D12, se aislaron y se utilizan para producir fluido ascítico de

ratones BALB / c. Los anticuerpos anti-hemoglobina se purificaron después de fluido ascítico y se usaron en inmunoensayos de tipo sándwich para la detección de la hemoglobina.

Los anticuerpos anti-transferrina se produjeron siguiendo un procedimiento similar. Un par de líneas de células de hibridoma, TF31E5G1 y TF32A2G 1, se aislaron y se usaron en inmunoensayos de tipo sándwich para detectar transferrina.

Ejemplo 2

Preparación de conjugados de partículas de oro y anticuerpos

Se escogieron partículas de oro conjugadas con anticuerpos como los medios de detección en un inmunoensayo de flujo lateral. Una solución de partículas de oro coloidal se preparó mediante la reducción de cloruro de oro con citrato de sodio en el punto de ebullición de la mezcla. Una rosa de solución coloidal de color púrpura de oro con partículas de oro de un tamaño alrededor de 10 a 40 nm se utilizó en la preparación de los conjugados anticuerpo-oro. Uno de los anticuerpos apareados se utilizó para la capa de partículas de oro en un valor de pH cercano al valor de pI del anticuerpo. Se usaron BSA y PEG para bloquear los sitios de unión restantes sobre las partículas de oro, para lavar y concentrar la solución de conjugado de oro anticuerpo. Una almohadilla, por lo general una almohadilla hecha de fibra de vidrio o de rayón, se sumergió en la solución de conjugado de oro y anticuerpo, y se secó después para que los conjugados anticuerpo-oro se depositaran en la almohadilla.

Ejemplo 3

Líneas de prueba y la línea de control

Se eligió una membrana de nitrocelulosa con un tamaño medio de poro de alrededor de 5 a 20 μm como la membrana de prueba. Los anticuerpos seleccionados se inmovilizaron sobre la membrana en las zonas de la línea de prueba especificadas. Una zona de la línea de control también se incluyó en membrana de prueba para asegurar el rendimiento físico de la prueba, en el que se inmoviliza un anticuerpo de tipo IgG de cabra anti-ratón.

Ejemplo 4

Montaje y Realización de una tira de prueba

Las **figuras 2-3** ilustran el montaje de una tira de ensayo para una detección simultánea de la transferrina y la hemoglobina basada en inmunoensayos de tipo sándwich.

Ejemplo 5

Detección de transferrina

Soluciones tampón de dilución (típicamente tampones PBS) en los colectores de muestras fecales se enriquecieron (complementado con transferrina) hasta una concentración final de transferrina en 10, 20, 40, 50, 75, y 100 ng / ml, respectivamente. Se recogieron tres muestras fecales aleatorias de individuos normales y se insertaron en dispositivos de recopilación contienen soluciones tampón enriquecidas de transferrina. Estas tres muestras se analizaron usando el dispositivo de prueba se muestra en la **figuras 2-3**. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**. Todas las soluciones de la muestra con un nivel de transferrina por encima del valor de corte de 30 ng / ml mostraron una señal positiva, y todas las muestras con la transferrina por debajo del valor de corte mostraron resultados negativos.

Tabla 1

Transferrina (ng/ml)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	-	-	-
20	-	-	-
40	+	+	+
50	+	+	+
75	+	+	+
100	+	+	+

Ejemplo 6

Detección de hemoglobina

5 Soluciones tampón de dilución (típicamente tampones PBS) en los colectores de muestras fecales se enriquecieron hasta una concentración final de hemoglobina en 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 20, y 2000 µg/ml, respectivamente. Se recogieron tres muestras fecales aleatorias de individuos normales y se insertaron en dispositivos de recopilación contienen soluciones tampón enriquecidas de hemoglobina. Estas tres muestras se analizaron usando el dispositivo de prueba se muestra en la **figuras 2-3**. Los resultados se muestran en la **Tabla 2**. Todas las soluciones de la muestra con un nivel de hemoglobina por encima del valor de corte de 0,2 ng / ml mostraron una señal positiva, y todas las muestras con la hemoglobina por debajo del valor de corte mostraron resultados negativos.

10 **Tabla 2**

Hemoglobina (µg/ml)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0,05	-	-	-
0,1	-	-	-
0,2	+	+	+
0,5	+	+	+
20	+	+	+
2000	+	+	+

Ejemplo 7

Diagnóstico diferencial de sangrado GI superior usando muestras fecales

15 La prueba combinada de hemoglobina y transferrina y un examen de guayacol se utilizaron para analizar las muestras de heces de los pacientes que experimentan problemas estomacales confirmados clínicamente identificados en **Tabla 3**. Los resultados del inmunoensayo de tipo sándwich de flujo lateral sobre la base de los anticuerpos anti-hemoglobina, solos sólo detectaron 7 de 62 casos positivos para la sangre fecal. El examen de guayacol, una prueba química que detecta la actividad de la peroxidasa del grupo hemo, identificó 25 casos. Sin embargo, la falta de especificidad de la prueba de guayacol efectuó la identificación de estos 25 casos cuestionables. Por otro lado, los anticuerpos anti-transferrina identificaron 51 de 62 casos positivos para la sangre fecal. La **Tabla 3** muestra los resultados. Por lo tanto, la transferrina es un marcador más sensible para la detección de sangrado GI superior. La combinación del inmunoensayo con transferrina y hemoglobina permite un diagnóstico diferencial de sangrado del tracto GI superior.

Tabla 3

Síntoma	Casos totales	Prueba hemoglobina	de Examen guayacol	con Prueba de transferrina
Sangrado de estómago	18	6+	10+	17+
Úlcera péptica	5	0+	2+	4+
Úlcera	14	1+	5+	12+
Operación	9	0+	4+	6+
Gastritis	11	0+	2+	9+
Pólipo	5	0+	2+	3+

Ejemplo 8

Diagnóstico de sangrado en el tracto GI superior usando muestras de vómito y de líquidos del sistema GI superior

5 En este ejemplo, siete muestras líquidas de vómito y estómago de pacientes del tracto GI superior clínicamente confirmados se analizaron de nuevo con el dispositivo de prueba de combinación de hemoglobina / transferrina y la prueba de guayacol. Los resultados de la **Tabla 4** muestran que todas las muestras dieron negativo en la prueba de guayacol y en el inmunoensayo para la hemoglobina como el marcador. Por otro lado, la transferrina dio positivo para todas las muestras, lo que indica sangre oculta partir de estas muestras del tracto GI superior.

Tabla 4

Muestra	Nº	Hemoglobina	Transferrina	Prueba de guayacol
Vómito	4	Todo negativo	Todo positivo	Todo negativo
Fluido de estómago	3	Todo negativo	Todo positivo	Todo negativo

10

Ejemplo 9

Diagnóstico de sangrado del tracto GI superior usando muestras fecales

15 **La Tabla 5** muestra los resultados de un ensayo de 45 muestras fecales de pacientes con trastornos del sistema GI inferior confirmados clínicamente. Cuarenta casos en los que la hemoglobina fue positiva, la transferrina también dio positivo. Los resultados también demuestran que la prueba de la hemoglobina y la prueba de la transferrina pueden complementarse entre sí para aumentar la sensibilidad de la prueba de detección de FOB. De cualquier prueba solo se perdió un par de muestras positivas, mientras que la prueba combinada (que determina FOB en base a un resultado positivo de cualquiera de las pruebas) había detectado, salvo en dos muestras positivas. Los resultados demuestran además que las pruebas de hemoglobina y de transferrina son más sensible que la prueba de guayacol.

20 **Tabla 5**

Muestra	Nº	Prueba de hemoglobina	Prueba de transferrina	Prueba combinada	Prueba de guayacol
Heces	45	40 +/5 -	42 +/3 -	43 +/2 -	16 +/29 -

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico diferencial de sangrado del tracto gastrointestinal superior en comparación con el tracto GI inferior, que comprende la detección de transferrina y hemoglobina en una muestra de heces utilizando un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, y la comparación de la cantidades de transferrina y hemoglobina detectadas con los respectivos valores predeterminados de la transferrina y hemoglobina, en el que el resultado de la detección es indicativa de sangrado en el tracto GI inferior cuando la cantidad de transferrina está por encima de un valor predeterminado para la transferrina y la cantidad de hemoglobina está también por encima de un valor predeterminado para hemoglobina, y en el que el resultado de la detección es indicativo de sangrado del tracto gastrointestinal superior cuando la cantidad de transferrina está por encima de un valor predeterminado para la transferrina y la cantidad de hemoglobina está por debajo de un valor predeterminado para la hemoglobina, por lo que se realiza un diagnóstico diferencial de sangrado en el tracto gastrointestinal superior en comparación con el tracto gastrointestinal inferior
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo comprende una tira de prueba, que comprende:
- 1) un sitio de la muestra para la aplicación de una muestra GI;
 - (2) un sitio de conjugado corriente abajo de dicho sitio de la muestra, en el que un anticuerpo anti-transferrina marcado y un anticuerpo anti-hemoglobina marcado se depositan en dicho sitio conjugado;
 - (3) una zona de ensayo corriente abajo de dicho sitio de conjugado, en el que dicha zona de prueba comprende dos sitios separados, uno de los cuales se inmoviliza con un anticuerpo anti-transferrina, y el otro está marcado inmovilizado con un anticuerpo anti-hemoglobina; y
 - (4) un sitio de control en el que un anticuerpo de control se inmoviliza al mismo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo comprende dos tiras de prueba, en el que la primera tira comprende:
- 1) un sitio de la muestra para la aplicación de una muestra GI;
 - (2) un sitio de conjugado corriente abajo de dicho sitio de la muestra, en el que un anticuerpo anti-transferrina marcado es depositado en dicho sitio conjugado;
 - (3) un sitio de conjugado corriente abajo de dicho sitio de la muestra, en el que dicha zona de prueba comprende un sitio de prueba en el que es inmovilizando el anticuerpo anti-transferrina;
 - (4) un sitio de control en el que un anticuerpo de control es inmovilizado al mismo; y
- en el que una segunda tira comprende:
- 1) un sitio de la muestra para la aplicación de una muestra GI;
 - (2) un sitio de conjugado corriente abajo de dicho sitio de la muestra, en el que un anticuerpo anti-hemoglobina marcado es depositado en dicho sitio conjugado;
 - (3) un sitio de conjugado corriente abajo de dicho sitio de la muestra, en el que dicha zona de prueba comprende un sitio de prueba en el que es inmovilizando el anticuerpo anti-hemoglobina; y
 - (4) un sitio de control en el que un anticuerpo de control es inmovilizado al mismo.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que dicha tira de prueba comprende una membrana de ensayo fabricada de nitrocelulosa.
5. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que dicho anticuerpo anti-transferrina marcado y dicho anticuerpo anti-hemoglobina marcado son ambos anticuerpos conjugados a partículas de oro.
6. Uso de de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral en el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

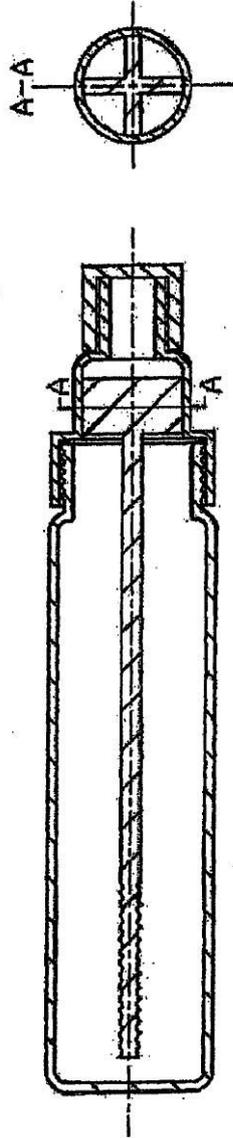


Figura 1B

Figura 1A

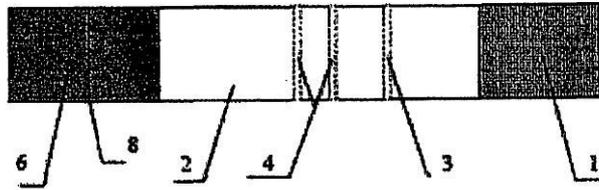


Figura 2

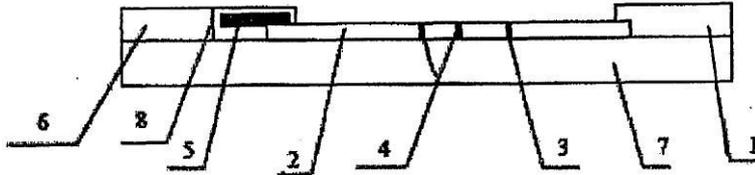


Figura 3



Fig. 4A



Fig. 4B

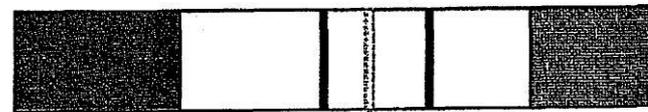


Fig. 4C

Figura 4A-4C

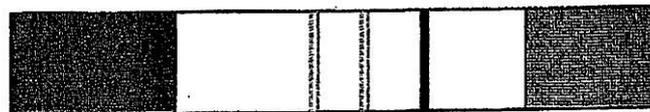


Figura 5



Figura 6