

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 895**

21 Número de solicitud: 200931127

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.12.2009

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.07.2014

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 200702152 27.07.2007

71 Solicitantes:

INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA APLICADA, S.A.
(100.0%)

Hermanos García Noblejas, 39
28037 Madrid ES

72 Inventor/es:

VELA OLMO, Carmen;
VENTEO MORENO, Ángel Antonio y
SANZ FERNÁNDEZ, Antonio José

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Inmunoensayo de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos**

57 Resumen:

El inmunoensayo de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos específicos de un antígeno diana en una muestra, en donde el antígeno diana es un virus del género Arterivirus y en concreto, el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), comprende poner en contacto dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dichos anticuerpos específicos de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador; y detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador. El inmunoensayo puede utilizarse, entre otras aplicaciones, en el diagnóstico de infecciones causadas por dicho virus con elevada sensibilidad y especificidad.

ES 2 479 895 A1

DESCRIPCIÓN**INMUNOENSAYO DE DOBLE RECONOCIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS****CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La invención se relaciona, en general, con un inmunoensayo de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos en una muestra, de elevada especificidad y sensibilidad. La invención también se relaciona con un kit que comprende los componentes necesarios para llevar a cabo dicho inmunoensayo.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Un inmunoensayo es un ensayo basado en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo que permite detectar, y, opcionalmente, cuantificar, antígenos o anticuerpos. Los inmunoensayos pueden clasificarse en inmunoensayos que utilizan reactivos (antígenos o anticuerpos) no-marcados y los inmunoensayos que utilizan reactivos
15 marcados en los cuales el reactivo (antígeno o anticuerpo) está marcado con un marcador, tal como un isótopo radiactivo, una enzima, un fluoróforo o una sustancia implicada en una reacción (químico) luminiscente, dando lugar a los denominados radioinmunoensayos (e.g., RIA, IRMA), inmunoensayos enzimáticos (e.g., EMIT, CEDIA, ELISA), fluoroinmunoensayos (e.g., FPIA, SLFIA, FETI, DELFIA) o
20 luminoimunoensayos, respectivamente.

- Entre los inmunoensayos que utilizan reactivos marcados se encuentran los inmunoensayos homogéneos y los inmunoensayos heterogéneos; estos últimos comprenden la realización de una o más etapas de separación del antígeno o anticuerpo no unido al otro miembro del par de unión (antígeno o anticuerpo) el cual, en general,
25 estará unido a una fase sólida o soporte, por ejemplo, microplacas, partículas magnéticas, membranas de nitrocelulosa, etc. Asimismo, dependiendo del diseño del ensayo, los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos, dependiendo de si el reactivo (antígeno o anticuerpo) marcado se añade en cantidad limitada o en exceso, respectivamente.

- 30 Los inmunoensayos permiten identificar antígenos (técnicas directas) o bien anticuerpos frente a un antígeno (técnicas indirectas). Entre estas técnicas indirectas se encuentran los inmunoensayos indirectos y los inmunoensayos de bloqueo o competición. Los inmunoensayos indirectos, a pesar de tener una elevada sensibilidad,

presentan problemas de especificidad por los falsos positivos obtenidos, normalmente por los problemas de fondo inespecífico. Además, no permiten detectar IgMs porque normalmente se usan anticuerpos anti-IgGs, por lo que no detectan a los animales positivos hasta las 2-3 semanas post-infección o post-vacunación. Los inmunoensayos de bloqueo o competición, en general, son más específicos que los inmunoensayos indirectos pero menos sensibles.

Debido a la especificidad y sensibilidad de los inmunoensayos, se han desarrollado numerosos inmunoensayos para diversas aplicaciones, tanto para su empleo en el análisis de muestras medioambientales o de alimentos como con fines de diagnóstico. Entre las infecciones causadas por virus animales que pueden ser diagnosticadas mediante inmunoensayos se encuentran, a modo ilustrativo, la Lengua Azul y el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS).

La Lengua Azul es una enfermedad causada por el virus de la Lengua Azul (BTV, del inglés “Blue Tongue Virus”), un arbovirus que infecta de forma natural a rumiantes domésticos y salvajes, camélidos y algunos otros herbívoros, tales como elefantes, aunque la enfermedad afecta casi exclusivamente a las ovejas, originando cursos clínicos agudos o subagudos. En vacas y cabras, la enfermedad clínica es rara, y, cuando se presenta, es mucho más suave que en ovejas. La oveja afectada puede morir después de una enfermedad aguda o crónica, o puede recuperarse con la pérdida de peso y/o roturas de lana. Actualmente existen 24 serotipos de BTV reconocidos. Las pruebas recomendadas para la detección de anticuerpos y serogrupos específicos de BTV incluyen la inmunodifusión en gel de agar y un ELISA competitivo, preferentemente éste último debido a su mayor exactitud y adaptación a rápidas pruebas convencionales de laboratorio y tecnología de lectura. La prueba recomendada para detectar anticuerpos de serotipos específicos del BTV es el test de neutralización.

El virus causante del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV, del inglés “Porcine Reproductive and Respiratory Virus”) es un arterivirus que causa el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). Dicho virus puede causar problemas reproductivos importantes en cerdas adultas que pueden terminar en abortos así como problemas respiratorios, entre otros, en cerdos neonatos o en cerdos en desarrollo. La patente europea EP 952219 B1 describe un método para el diagnóstico de PRRSV que comprende poner en contacto una muestra biológica de un animal con una proteína de fusión recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos de la

proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV fusionada a un fragmento de la proteína del gen 10 del fago T7.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Ahora se ha observado, sorprendentemente, que la adición de un conjugado que comprende un antígeno y un marcador a un complejo antígeno-anticuerpo aumenta la especificidad y sensibilidad de un inmunoensayo para la detección de anticuerpos específicos de dicho antígeno.

10 El inmunoensayo proporcionado por esta invención ha sido denominado “inmunoensayo de doble reconocimiento” ya que comprende el reconocimiento y unión de dos unidades del antígeno diana al anticuerpo específico de dicho antígeno diana, uno de ellos formando parte de un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador. Dicho inmunoensayo ha sido validado en sueros de referencia para la detección de anticuerpos específicos del virus del síndrome respiratorio y reproductivo
15 porcino (PRRSV) (Ejemplo 1) y posee una elevada especificidad y sensibilidad.

 Dicho inmunoensayo de doble reconocimiento se puede utilizar para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de antígenos de organismos patógenos en una muestra de ensayo de un sujeto, y, de este modo, diagnosticar la infección causada por un organismo, tal como un organismo patógeno en un sujeto susceptible de
20 ser infectado por dicho organismo, así como para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de antígenos tumorales en una muestra de ensayo de un sujeto, y, de este modo, diagnosticar la existencia de un tumor o de un cáncer en un sujeto, preferentemente, en un ser humano, o para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de alérgenos en una muestra de ensayo de un sujeto, y, de este
25 modo, diagnosticar la existencia de una reacción alérgica frente a dicho alérgeno en dicho sujeto, preferentemente, en un ser humano.

 Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un inmunoensayo para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra, en el que dicho antígeno diana es un virus del género *Arterivirus*, que comprende poner en contacto
30 dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dicho anticuerpo específico de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador bajo condiciones que permiten la formación de un complejo

antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, y detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un inmunoensayo para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra, en el que dicho antígeno
 5 diana es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), que comprende poner en contacto dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dicho anticuerpo específico de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador bajo condiciones que permiten la
 10 formación de un complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, y detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un soporte que comprende un antígeno diana, en el que dicho antígeno diana es un virus del género *Arterivirus*,

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un soporte que comprende un antígeno diana, en el que dicho antígeno diana es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) y un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención se relaciona con un inmunoensayo, en adelante inmunoensayo de la invención, para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra, en el que dicho antígeno diana es un virus del género *Arterivirus*, que comprende:

- 25 a) poner en contacto dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dicho anticuerpo específico de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo;
- b) añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-
 30 anticuerpo-antígeno/marcador; y
- c) detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador.

El inmunoensayo de la invención permite detectar anticuerpos específicos de antígenos diana en una muestra de ensayo. Un anticuerpo es una inmunoglobulina

producida por células de la serie de los linfocitos B y secretadas por células plasmáticas en respuesta a una estimulación por un antígeno, que reconoce específicamente dicho antígeno y es capaz de unirse selectivamente a dicho antígeno.

El término “antígeno”, tal como aquí se utiliza, se refiere, en general, a cualquier sustancia capaz de unirse específicamente a un anticuerpo, o de inducir una respuesta inmunitaria o de inducir la formación de anticuerpos, e incluye células (e.g., células tumorales, etc.), organismos (e.g., virus, bacterias, hongos, protozoos, nematodos, etc.), tanto enteros como partes o componentes de los mismos (e.g., proteínas, péptidos, lipopolisacáridos, carbohidratos, etc.), de origen nativo, sintético o recombinante, idénticos o similares (es decir, capaces de ser reconocidos por anticuerpos específicos de antígenos nativos) a los antígenos nativos de un organismo o de una célula, alergenicos, etc. Prácticamente cualquier antígeno puede ser utilizado en la puesta en práctica del inmunoensayo de la invención para detectar anticuerpos específicos de dicho antígeno (antígeno diana).

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de antígenos virales incluyen antígenos de virus infecciosos y/o patógenos de animales, incluyendo seres humanos, tales como virus de las familias: *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Arteriviridae*, *Birnaviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, etc., que incluyen arbovirus, arterivirus, birnavirus, calicivirus, citomegalovirus, herpesvirus, papilomavirus, parvovirus, pestivirus, poliovirus, retrovirus, rinovirus, rotavirus, etc. Entre dichos virus se encuentran virus patógenos de ganado porcino, por ejemplo, parvovirus porcino (PPV), el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV), el virus de la fiebre aftosa (FMDV), el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), el circovirus porcino, etc.; patógenos de ganado bovino, tales como el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), el virus de la rinotraqueitis bovina (IBRV), el virus de la lengua azul (BTV), etc.; patógenos de conejos, tales como el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), etc.; patógenos de aves, por ejemplo, el virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV), el pneumovirus aviar, etc. En una realización particular, dicho virus es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV).

El inmunoensayo de la invención puede utilizarse para detectar anticuerpos específicos de antígenos diana en una muestra sospechosa de contener dichos anticuerpos (muestra de ensayo), tal como una muestra biológica, una muestra ambiental, una muestra de laboratorio, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de
5 muestras biológicas incluyen tanto muestras de tejidos como de fluidos corporales susceptibles de contener anticuerpos específicos de dicho antígeno diana (e.g., sangre, suero, plasma, leche, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, exudados titulares, etc.).

La muestra de ensayo puede ser una muestra de origen animal sospechosa de contener anticuerpos específicos de antígenos diana. En una realización particular, dicha
10 muestra de ensayo es una muestra de ganado bovino, canino, caprino, equino, felino, leporino, ovino, porcino, etc., o una muestra de un ser humano.

Antes de ponerse en contacto con el antígeno diana, la muestra de ensayo puede ser sometida (o no) a un tratamiento previo, precipitada, fraccionada, separada, diluida, concentrada, o purificada.

En general, la muestra de ensayo se obtendrá por métodos convencionales, conocidos por los técnicos en la materia, dependiendo de la naturaleza de la muestra. En una realización particular, dicha muestra de ensayo es una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, suero o plasma, que puede obtenerse por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante una extracción de sangre, o una muestra de saliva,
15 que puede obtenerse mediante el empleo de torundas, etc.

De acuerdo con el inmunoensayo de la invención, el antígeno diana se pone en contacto con dicha muestra sospechosa de contener anticuerpos específicos de dicho antígeno diana (es decir, capaces de reconocer específicamente o de unirse selectivamente a dicho antígeno diana) bajo condiciones que permiten la formación de
25 un complejo antígeno-anticuerpo [etapa a)]. Si la muestra de ensayo contiene anticuerpos específicos de dicho antígeno diana, entonces se formará dicho complejo antígeno-anticuerpo; en caso contrario, no se formará dicho complejo. Por tanto, según la invención, dicho antígeno diana actúa como reactivo de captura de anticuerpos específicos de dicho antígeno diana. Las condiciones adecuadas para que tenga lugar la
30 formación del complejo antígeno-anticuerpo son conocidas por los expertos en la materia.

Posteriormente, se añade un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-

anticuerpo-antígeno/marcador [etapa b)] y se detecta dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador [etapa c)]. Si la muestra de ensayo contiene anticuerpos específicos de dicho antígeno diana, se habrá formado previamente un complejo antígeno-anticuerpo, con lo que, cuando se pone en contacto dicho complejo antígeno-anticuerpo con dicho conjugado que comprende el antígeno diana y el marcador, en las condiciones adecuadas, se forma el complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, que será visualizado mediante la técnica apropiada dependiendo del marcador utilizado, tal como se menciona más adelante; mientras que, en caso contrario, es decir, cuando la muestra de ensayo no contiene anticuerpos específicos de dicho antígeno diana, entonces no se formará dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador. Las condiciones adecuadas para que tenga lugar la formación del complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador son conocidas por los expertos en la materia.

El término “marcador”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un reactivo indicador que permite detectar el complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, tal como una enzima que cataliza una reacción detectable, un compuesto que genera una señal cuando forma parte del complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho marcador puede ser una enzima (e.g., peroxidasa, glicosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, etc.), un compuesto fluorescente o fluoróforo (e.g., fluoresceína, rhodamina, etc.), un compuesto (químico)luminiscente (e.g., dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio, luminol, etc.), elementos radiactivos (azufre, yodo, etc.), etc. En una realización particular, dicho marcador es una peroxidasa. La selección de un marcador particular no es crítica, siempre y cuando sea capaz de producir una señal por sí mismo o conjuntamente con unas o más sustancias adicionales.

El conjugado que comprende dicho antígeno diana y dicho marcador puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia.

El complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador formado puede ser detectado o visualizado por cualquier técnica apropiada, dependiendo del marcador elegido, conocida por los técnicos en la materia, utilizando los dispositivos apropiados, por ejemplo, mediante técnicas basadas en métodos colorimétricos, fluorimétricos, (químico)luminiscentes, radiactivos, etc., todas ellas conocidas por los técnicos en la materia.

A modo ilustrativo, cuando el marcador es una enzima, la detección del complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador puede llevarse a cabo poniendo en contacto dicho complejo con un sustrato apropiados y, opcionalmente, con los activadores y/o agentes de amplificación enzimáticos apropiados. Ejemplos ilustrativos de dichos sustratos incluyen:

- Para la fosfatasa alcalina:

Cromogénico: sustratos basados en p-nitrofenil fosfato (p-NPP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblue tetrazolium (BCIP/NPT), etc.

Fluorogénico: fosfato de 4-metilumbelifenilo (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (C P P C Q), 3,6-fluoresceín-difosfato (3,6-FDP), etc.

- Para peroxidasas:

Cromogénico: sustratos basados en ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetracloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), etc.

Fluorogénico: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas y benzotiazinas reducidas, incluyendo el reactivo Amplex[®] Red, Amplex UltraRed, dihidroxantenos reducidos, etc.

- Para glicosidasas:

Cromogénico: sustratos basados en o-nitrofenil- β -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactósido y 4-metilumbelifenil- β -D-galactósido (MUG) para β -D-galactosidasa, etc.

Fluorogénico: resorufin β -D-galactopiranosido, fluoresceín digalactósido (FDG), fluoresceín diglucurónido, 4-metilumbeliferil beta-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil beta-D-galactopiranosido, cumarin beta-D- galactopiranosidos fluorados, etc.

En una realización particular, dicho marcador es una peroxidasa, tal como la peroxidasa de rábano picante, y el sustrato cromogénico es TMB.

El inmunoensayo de la invención también puede ser utilizado para determinar la cantidad (cuantificar) de anticuerpos específicos de un antígeno diana en una muestra de

ensayo ya que, con muchos marcadores, e.g., enzimas, la cantidad de anticuerpo presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada.

El inmunoensayo de la invención es un inmunoensayo que utiliza antígenos marcados para detectar anticuerpos, homogéneo o heterogéneo. En una realización particular, dicho inmunoensayo es un inmunoensayo que utiliza antígenos marcados, heterogéneo; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de tales inmunoensayos incluyen, dependiendo del marcador utilizado, inmunoensayos enzimáticos, tales como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), fluoroinmunoensayos, tales como DELFIA (fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos), luminoimunoensayos, radioinmunoensayos tales como RIA (radioinmunoensayo heterogéneo y competitivo), IRMA (radioinmunoensayo heterogéneo y no competitivo), etc. En una realización particular, dicho inmunoensayo es un ELISA.

Para realizar dichos inmunoensayos heterogéneos, el antígeno diana se inmoviliza, directa o indirectamente, sobre un soporte, tal como un pocillo de una placa de microtitulación, perlas magnéticas, perlas no magnéticas, columnas, matrices, membranas, etc. Estos materiales se pueden utilizar en las formas convenientes, tales como películas, hojas, placas, etc., o pueden utilizarse para recubrir portadores inertes (e.g., papel, cristal, películas de plástico, etc.). La inmovilización del antígeno diana sobre dicho soporte incluye interacciones iónicas, hidrofóbicas, covalentes y/o similares.

En una realización particular, el antígeno diana se inmoviliza, directa o indirectamente, sobre un soporte, tal como un pocillo de una placa de microtitulación. La muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos específicos de dicho antígeno diana se incuba con dicho antígeno diana durante un periodo de tiempo y bajo condiciones apropiadas para que se formen complejos antígeno-anticuerpo. Después de lavar el pocillo para retirar los reactivos no unidos al antígeno, se añade un conjugado que comprende dicho antígeno diana unido a un marcador y se deja incubar durante un periodo de tiempo y bajo condiciones apropiadas para que se formen complejos antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador. Tras lavar para retirar los reactivos no unidos, se procede a revelar la formación de dichos complejos antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador. La detección de dichos complejos antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador es indicativa de la presencia de anticuerpos específicos de dicho antígeno diana en la muestra de ensayo. Este tipo de ensayo permite, además, si se

desea, cuantificar la cantidad de anticuerpos específicos del antígeno diana en la muestra de ensayo.

La formación del complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador es indicativa de la presencia de anticuerpos específicos del antígeno diana en la muestra de ensayo.

5 Por tanto, el inmunoensayo de la invención se puede utilizar para diagnosticar la infección causada por un organismo, tal como un organismo patógeno (e.g., virus, bacteria, hongo, protozoo, nematodo, etc.), en un sujeto susceptible de ser infectado por dicho organismo. Tal como aquí se utiliza, “sujeto” se incluye a cualquier animal, incluido el ser humano, en particular, animales vertebrados, preferentemente mamíferos, 10 tales como caballos, cerdos, conejos, gatos, ovejas, perros, vacas, seres humanos, etc.

En una realización particular, el inmunoensayo de la invención puede ser utilizado para diagnosticar la infección causada por PRRSV en animales susceptibles de ser infectados por PRRSV independientemente de que desarrollen o no sintomatología clínica (reservorios), e.g., ganado porcino, etc. En una realización concreta, dicho 15 inmunoensayo consiste en un ELISA (Ejemplo 1) en el que el antígeno de PRRSV es una proteína de fusión que comprende la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV, el cual se inmoviliza sobre un soporte antes de ponerse en contacto con la muestra de ensayo procedente de animales susceptibles de ser infectados por PRRSV sospechosa de contener anticuerpos específicos frente a PRRSV, con lo que si dicha muestra de ensayo 20 tiene dichos anticuerpos, estos se unirán al antígeno de PRRSV. A continuación, tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade de nuevo el mismo antígeno de PRRSV (proteína de fusión que comprende la proteína N de PRRSV) conjugado a un marcador (e.g., peroxidasa), y, en caso de que la muestra de ensayo contuviera anticuerpos frente a dicho antígeno de PRRSV, dichos anticuerpos podrían capturar la 25 proteína de fusión que comprende la proteína N de PRRSV conjugada al marcador a pesar de estar unidos a la proteína de fusión que comprende la proteína N de PRRSV inmovilizada sobre el pocillo. El complejo antígeno de PRRSV-anticuerpo-antígeno de PRRSV/peroxidasa se detecta tras adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de la peroxidasa (e.g., TMB).

30 Asimismo, el inmunoensayo de la invención se puede utilizar para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de dicho antígeno diana en una muestra sospechosa de contener dichos anticuerpos, y, de este modo, detectar la presencia del virus.

Si se desea, para la puesta en práctica del inmunoensayo de la invención, se pueden utilizar, además, controles positivos y negativos.

El inmunoensayo de la invención ha sido denominado “inmunoensayo de doble reconocimiento” ya que comprende el reconocimiento y unión de dos unidades del
 5 antígeno diana al anticuerpo específico de dicho antígeno diana, uno de ellos formando parte de un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador.

El inmunoensayo de la invención presenta una elevada especificidad y sensibilidad. Esta elevada sensibilidad parece ser debida a que el inmunoensayo de doble reconocimiento de la invención aúna las dos principales ventajas de los
 10 inmunoensayos indirectos y de competición ya que, por un lado, al igual que los inmunoensayos indirectos es capaz de detectar todo tipo de anticuerpo que se una a un antígeno diana (y no solo los anticuerpos que se unen a un epítipo determinado, como en los ensayos de competición), y, por otro lado, al igual que en los ensayos de competición (o bloqueo) se pueden usar elevadas cantidades de muestra en el ensayo
 15 (sin diluir o poco diluidas), lo que favorece la detección de positivos débiles (en los ensayos indirectos es muy raro que se utilicen diluciones de la muestra inferiores a 1/100). Asimismo, la elevada especificidad del inmunoensayo de la invención parece ser debida a que el antígeno diana debe ser reconocido dos veces por el mismo anticuerpo, la primera vez, cuando se pone en contacto con el antígeno diana
 20 inmovilizado sobre la fase sólida o soporte utilizado, y, la segunda vez, cuando se pone en contacto con el antígeno diana marcado (conjugado antígeno diana unido a marcador), normalmente en solución o sin inmovilizar.

Para la puesta en práctica del inmunoensayo de la invención se pueden utilizar, además, si se desea, controles positivos y negativos.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante kit de la invención, en el que dicho antígeno diana es un virus del género *Arterivirus*, que comprende:

- i) un soporte que comprende un antígeno diana; y
- ii) un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador.

30 Las características de dicho soporte (i) y del antígeno diana inmovilizado sobre el mismo, así como las de dicho conjugado (ii) han sido mencionadas previamente.

En una realización particular, el kit de la invención comprende, además de dicho soporte (i) y conjugado (ii), unos medios para revelar dicho marcador.

Dicho kit de la invención es particularmente útil para poner en práctica el inmunoensayo de la invención.

Dicho antígeno diana es susceptible de ser reconocido por un anticuerpo específico del mismo. Por tanto, el kit de la invención puede ser utilizado para detectar,
5 y si se desea cuantificar anticuerpos específicos de dicho antígeno diana en una muestra sospechosa de contener dichos anticuerpos.

En una realización particular, el kit de la invención puede ser utilizado para diagnosticar la infección causada por PRRSV en animales susceptibles de ser infectados por dicho virus (e.g., ganado porcino, etc.) independientemente de que presenten o no
10 sintomatología clínica, y comprende un soporte que comprende un antígeno de PRRSV (e.g., una proteína de fusión que comprende la proteína N de PRRSV o cualquier otro antígeno de PRRSV) y un conjugado que comprende dicho antígeno de PRRSV conjugado a un marcador (e.g., peroxidasa) y, opcionalmente, medios para revelar la presencia de complejo antígeno de PRRSV-anticuerpo-antígeno de PRRSV/marcador
15 (e.g., TMB cuando el marcador es una peroxidasa).

Asimismo, el kit de la invención se puede utilizar para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos del antígeno diana, y, de este modo, diagnosticar la presencia del virus en la muestra.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados
20 limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento para la detección de 25 anticuerpos frente al virus respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV)

Se realizó este ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento (ELISA DR) para detectar anticuerpos específicos de PRRSV y comparar los resultados obtenidos con los de otros ensayos ya existentes (ELISA indirecto y ELISA de bloqueo) para la detección de anticuerpos específicos de PRRSV.

30

Materiales y métodos

P10-N (antígeno de PRRSV)

Como antígeno de PRRSV se utilizó la proteína de fusión recombinante identificada como P10-N, que comprende la secuencia de aminoácidos de la nucleocápsida de PRRSV, aislado europeo, fusionada a la secuencia de aminoácidos 1-259 de la proteína del gen 10 del fago T7, cuya obtención se describe en el Ejemplo 3
 5 de la patente europea EP 952219 B1.

Conjugado (P10-N)-HRPO

Para su uso como conjugado, la proteína de fusión P10-N se conjugó con peroxidasa (HRPO) según el método descrito por Nakane & Kawaoi [Nakane, P.K. &
 10 Kawaoi, A. (1974). Peroxidase-labeled antibody: A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091] modificado. Cada proceso de marcaje generó un lote de producción de conjugado. Cada uno de los lotes de producción se almacenó diluido en PBS pH 7,4 y solución preservante (Surmodics-TM, Diarect AG) 50% (v/v) y se almacenó a +4°C hasta su utilización.

15

Sueros

Se analizaron 36 sueros de campo procedentes de cerdos de áreas geográficas diferentes que dieron positivo o negativo en otros ensayos (ELISA indirecto y ELISA de bloqueo) para la detección de anticuerpos específicos de PRRSV (Tabla 2).

20

ELISA indirecto utilizando el kit INGEZIM® PRRS EUROPA 1.1.PRS K1 (INGENASA)

Se añaden 100 µl de cada uno de los sueros problema a la dilución 1/100 en los pocillos y se incuba durante 1 h a 37°C. A continuación, la placa se lava 4 veces con
 25 PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20. Seguidamente se añaden 100 µl de anticuerpo específico de IgG de cerdo conjugado con peroxidasa a una dilución predeterminada a cada pocillo, se tapa la placa y se incuba durante 45 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Posteriormente, se lava la placa 5 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20, se añaden 100 µl de sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-
 30 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en cada pocillo y la reacción se mantiene durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 100 µl de dodecilsulfato sódico

(SDS) al 2% para parar la reacción y se lee la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.

ELISA de bloqueo utilizando el kit INGEZIM® PRRS COMPAC 1.1.PRS K3 (INGENASA)

Se añaden los sueros problemas a una dilución $\frac{1}{2}$ en los pocillos y se incuba durante 1 h a 37°C. A continuación, la placa se lava 4 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20. Seguidamente se añaden 100 µl de anticuerpo monoclonal específico de la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV conjugado con peroxidasa a una dilución predeterminada y se incuba durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se lava la placa 5 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20, se añaden 100 µl de sustrato ABTS en cada pocillo y la reacción se mantiene durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 100 µl de SDS al 2% para parar la reacción y se lee la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.

15

Ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento (ELISA DR)

Se incuban placas de poliestireno de 96 pocillos con proteína de fusión P10-N (antígeno de PRRSV) durante 18 horas a 4°C en tampón carbonato pH 9,6 -BSA (seroalbúmina bovina) con el fin de tapizar dichas con el antígeno de PRRSV (proteína de fusión P10-N). A continuación, las placas se lavan con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20 pH7,4 se estabilizan durante 1 hora a temperatura ambiente en solución estabilizante (Surmodics-TM, Diarect AG) y se secan. Las placas que no se van a utilizar inmediatamente, se envasan de forma individual. y se almacenan a 4°C.

A continuación, sobre las placas tapizadas con el antígeno de PRRSV se añaden los sueros a analizar a una dilución 1/5 en PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20 en un volumen de 50 µl y se incuban durante 1 hora a 37°C. Tras lavar el material no adherido con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20, las placas se incuban con un conjugado (P10-N)-HRPO a una dilución predeterminada y fijada caso por caso, durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Finalizado ese periodo de tiempo, las placas se lavan con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20 y la reacción se revela durante 15 minutos tras adición del sustrato TMB. Tras parar la reacción con ácido sulfúrico 0,5 M se realiza la lectura de la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA.

Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, en donde puede apreciarse que el ensayo proporcionado por esta invención (ELISA DR) es capaz de detectar anticuerpos específicos de PRRSV y que, además, dicho ensayo ELISA DR discrimina entre sueros positivos y negativos, comparándolo con los inmunoensayos ya existentes de competición e indirectos.

Tabla 1

10 **Comparación de los resultados obtenidos utilizando el ensayo ELISA DR con los resultados obtenidos utilizando un ELISA indirecto y un ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos de PRRSV**

Valores de Absorbancia*		
ELISA de doble reconocimiento [ELISA DR]	INGEZIM® PRRS EUROPA 1.1.PRS K1 [ELISA indirecto]	INGEZIM® PRRS COMPAC 1.1.PRS K3 [ELISA de bloqueo]
1,186	0,499	0,1715
1,86	0,8365	0,2045
3,071	1,4325	0,0965
0,212	0,2225	1,0515
0,437	0,37	0,9945
0,214	0,151	1,1335
1,423	0,7005	0,193
1,241	0,4605	1,391
0,22	0,566	1,2915
0,212	0,561	1,19
0,205	0,1155	0,971
0,411	0,206	1,285
0,319	0,2295	1,133
1,209	0,4545	0,817
0,474	0,3945	0,7885
0,183	0,166	1,1675
0,909	0,3875	0,666
0,74	0,4795	0,726
0,206	0,102	1,13
0,263	0,3665	0,9715
0,342	0,2145	0,9855
1,048	0,4905	0,69
0,692	0,2455	0,8435
1,095	0,2635	0,7035
1,046	0,355	1,2675
0,833	0,1495	0,994
0,706	0,2845	0,885

<i>1,777</i>	<i>0,383</i>	<i>0,854</i>
<i>1,24</i>	<i>0,5405</i>	1,0265
<i>1,009</i>	<i>0,4415</i>	<i>0,8255</i>
<i>1,306</i>	<i>0,425</i>	<i>0,447</i>
<i>0,591</i>	0,223	1,18
Cut off: 0,3568	Cut off: 0,256725	Cut off: 0,8655

*Valores de absorbancia obtenidos sobre una colección de 36 sueros de campo.
En sombreado, negrilla y cursiva, se indican los sueros considerados positivos por cada uno de los ensayos.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra en el que dicho antígeno diana es un virus del género *Arterivirus*, que
5 comprende:
- a) poner en contacto dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dicho anticuerpo específico de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo;
 - b) añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador
10 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador; y
 - c) detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador.
- 15 2. Inmunoensayo según la reivindicación 1, en el que dicho virus es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV)
3. Un inmunoensayo para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra en el que dicho antígeno diana es el virus del síndrome reproductivo y
20 respiratorio porcino (PRRSV), que comprende:
- a) poner en contacto dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dicho anticuerpo específico de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo;
 - b) añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador
25 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador; y
- detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador.
4. Inmunoensayo según la reivindicación 1 ó 3, en el que dicha muestra
30 sospechosa de contener anticuerpos específicos de dicho antígeno diana es una muestra biológica.

5. Inmunoensayo según la reivindicación 1 ó 3, en el que dicho marcador es una enzima, un compuesto fluorescente o fluoróforo, un compuesto (químico)luminiscente o un elemento radiactivo.

5 6. Inmunoensayo según la reivindicación 5, en el que dicho marcador es una peroxidasa.

7. Inmunoensayo según la reivindicación 1 ó 3, en el que dicho inmunoensayo es un inmunoensayo enzimático, un fluoroinmunoensayo, un luminoimunoensayo o un
10 radioinmunoensayo.

8. Inmunoensayo según la reivindicación 7, en el que dicho inmunoensayo es un ELISA.

15 9. Inmunoensayo según la reivindicación 1 ó 3, en el que dicho antígeno diana está inmovilizados sobre un soporte.

10. Inmunoensayo según la reivindicación 1 ó 3, que comprende, además, cuantificar la cantidad de anticuerpos específicos de dicho antígeno diana presentes en
20 dicha muestra sospechosa de contener dichos anticuerpos.

11. Inmunoensayo según la reivindicación 3, en el que dicho antígeno de PRRSV es una proteína de fusión que comprende la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV y dicho conjugado comprende dicha proteína de fusión que comprende la
25 proteína N de PRRSV conjugada a una peroxidasa.

12. Un kit que comprende:

- (i) un soporte que comprende un antígeno diana, en el que dicho antígeno diana es un virus del género *Arterivirus*; y
- 30 (ii) un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador.

13. Kit según la reivindicación 12, que comprende, además, unos medios para revelar dicho marcador.

14. Kit según la reivindicación 12, en el que el antígeno del *Arterivirus* es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).

5 15. Uso de un kit según la reivindicación 12, para detectar, y si se desea, cuantificar anticuerpos específicos de dicho antígeno diana en una muestra sospechosa de contener dichos anticuerpos.

16. Un kit que comprende:

- 10 (i) un soporte que comprende un antígeno diana, en el que dicho antígeno diana es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV); y
- (ii) un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador.

15 17. Kit según la reivindicación 16, para diagnosticar la infección causada por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) que comprende un soporte que comprende un antígeno de PRRSV y un conjugado que comprende dicho antígeno de PRRSV conjugado a un marcador, y, opcionalmente, medios para revelar la presencia de complejo antígeno de PRRSV-anticuerpo-antígeno de PRRSV/marcador.

20 18. Kit según la reivindicación 17, en el que dicho antígeno de PRRSV es una proteína de fusión que comprende la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV y dicho conjugado comprende dicha proteína de fusión que comprende la proteína N de PRRSV conjugada a una peroxidasa, y comprende, además, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

25

19. Uso de un kit según la reivindicación 16, para detectar, y si se desea, cuantificar anticuerpos específicos de dicho antígeno diana en una muestra sospechosa de contener dichos anticuerpos.



- ②① N.º solicitud: 200931127
②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.12.2009
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/533** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	FERRIN NEAL H et al. Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology Mayo 2004 (05.2004) VOL: 11 No: 3 Págs: 503-514 ISSN 1071-412X (ISSN print).	1-19
Y	CHEN S et al. Double-antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to SARS-associated coronavirus in human serum. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 20050801 Springer, Berlin, DE 01.08.2005 VOL: 24 No: 8 Págs: 549-553 ISSN 1435-4373 Doi: doi:10.1007/s10096-005-1378-7.	1-19
A	SEUBERLICH T et al. Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection and Differentiation of Antibodies Against European and North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, 20021101 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US 01.11.2002 VOL: 9 No: 6 Págs: 1183-1191 ISSN 1071-412X Doi: doi:10.1128/CDLI.9.6.1183-1191.2002.	1-19
A	WO 2006093797 A2 (MJ BIOLOG INC et al.) 08.09.2006, reivindicaciones; figuras.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.06.2014

Examinador
Javier Manso Tomico

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.06.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-19
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-19

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERRIN NEAL H et al. Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology Mayo 2004 (05.2004) VOL: 11 No: 3 Págs: 503-514 ISSN 1071-412X (ISSN print).	30.04.2004
D02	CHEN S et al. Double-antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to SARS-associated coronavirus in human serum. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 20050801 Springer, Berlin, DE 01.08.2005 VOL: 24 No: 8 Págs: 549-553 ISSN 1435-4373 Doi: doi:10.1007/s10096-005-1378-7.	01.08.2005
D03	SEUBERLICH T et al. Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection and Differentiation of Antibodies Against European and North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, 20021101 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US 01.11.2002 VOL: 9 No: 6 Págs: 1183-1191 ISSN 1071-412X Doi: doi:10.1128/CDLI.9.6.1183-1191.2002.	01.11.2002
D04	WO 2006093797 A2 (MJ BIOLOG INC et al.)	08.09.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un inmunoensayo tipo sándwich de doble antígeno para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), en el que dicho antígeno es una proteína de fusión que comprende la nucleocápsida (N) de PRRSV. Además divulga un kit para llevar a cabo el inmunoensayo y el uso del kit.

D01 divulga un ELISA de bloqueo altamente específico y repetible (bELISA) desarrollado sobre la base de la utilización de una proteína expresada de la nucleocápsida de PRRSV (N) como antígeno y un anticuerpo monoclonal biotinilado. Se analizaron sueros de 316 animales experimental y naturalmente infectados con VSRRP norteamericano y el suero de 370 animales no infectados, arrojando una sensibilidad diagnóstica del 97,8% y una especificidad diagnóstica del 100%.

D02 divulga un inmunoensayo ELISA sándwich con doble antígeno para la detección de un anticuerpo anti-coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en una muestra de suero humano. En este inmunoensayo se utiliza el mismo antígeno como antígeno para el coating y como antígeno para el conjugado marcado. Las cúpulas de microplacas están recubiertas con el antígeno y a continuación se ponen en contacto con la muestra de suero el mismo antígeno marcado con peroxidasa (HPR) y después se revelan con TMB.

D03 divulga un ELISA para la detección simultánea y diferenciación de los anticuerpos séricos dirigidos contra cualquiera de los dos tipos de PRRSV. Este ELISA se basa en la proteína recombinante de la nucleocápsida expresada en Escherichia coli.

D04 divulga un dispositivo para detectar la presencia de la proteína de la nucleocápsida (N), comprendiendo dicho dispositivo al menos un primer agente de unión (inmunoglobulina) movilizable situado en una primera parte de dicho dispositivo, el cual se une la proteína N del PRRSV en una muestra de fluido biológico de un sujeto para formar al menos un complejo de agente de unión unido a la proteína N, y al menos un segundo agente de unión (anticuerpo unido a partículas de oro), inmovilizado en una segunda parte de dicho dispositivo, el cual se une e inmoviliza dicho complejo, y en el que dicho dispositivo permite la detección de complejo inmovilizado para indicar la presencia de la proteína N en dicha muestra. Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un inmunoensayo doble antígeno para la detección de anticuerpos contra el virus de la PRRSV, por lo que las reivindicaciones 1-19 cumplirían con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Tomando en consideración D01 como el documento más cercano al objeto de la invención la diferencia entre este y el objeto de la invención estaría en la utilización de dos antígenos idénticos en un ensayo ELISA tipo sándwich. El efecto técnico resultante de esa diferencia sería que dicho ensayo de doble antígeno es capaz de discriminar entre sueros positivos y negativos comparándolos con otros ensayos ELISA existentes (ver tabla 1, página 15). El problema técnico que plantea la invención sería la provisión de métodos más sensitivos y específicos para la detección de anticuerpos de virus PRRSV. Sin embargo la solución aportada por la presente invención no supone una contribución sobre el estado de la técnica puesto que en D01 se obtienen valores de sensibilidad y especificidad del 97% y 100% respectivamente. Así pues el problema técnico que plantearía la presente invención pasaría a considerarse como la provisión de inmunoensayos alternativos a los ya existentes para la detección de anticuerpos PRRSV. En vista de los documentos del estado de la técnica, para el experto en la materia sería obvia la aplicación del inmunoensayo de doble antígeno divulgado en D02 para la detección de anticuerpos anti proteína de la nucleocápsida N del virus PRRSV, como ensayo alternativo al inmunoensayo ELISA de D01. Por tanto, las reivindicaciones 1-19 carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.