

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 742**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.1999 E 05008770 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1568996**

54 Título: **Mejora de ensayos de fijación mediante análisis multiepitópico y determinación combinada de antígeno y anticuerpo**

30 Prioridad:

22.06.1998 DE 19827714

26.08.1998 DE 19838802

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

23.10.2014

73 Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (100.0%)

SANDHOFER STRASSE 112-132

68305 MANNHEIM, DE

72 Inventor/es:

KARL, JOHANN, DR. y

HORNAUER, HANS, DR.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 511 742 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

Mejora de ensayos de fijación mediante análisis multiepitópico y determinación combinada de antígeno y anticuerpo

5 Se revela un método para detectar uno o varios analitos en una muestra, identificando el analito con diversos reactivos capaces de fijarse a los analitos. Además se revela una fase sólida para detectar un analito, constituida por un soporte no poroso y por áreas de ensayo separadas espacialmente, de tal modo que cada área de ensayo contiene reactivos diferentes. La presente invención se refiere a un método para la determinación simultánea de un antígeno y de un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, así como al uso de una fase sólida para la realización de este método.

10 Los métodos de detección inmunológica permiten determinar un gran número de analitos. Dichos métodos de detección inmunológica se basan en la capacidad de fijación específica de analitos mediante determinados analitos, como por ejemplo en las interacciones de tipo antígeno-anticuerpo. Básicamente las determinaciones inmunológicas se pueden realizar en una serie de formatos de ensayo, como por ejemplo los de ensayo tipo sandwich, indirecto, valoración por retroceso o puente.

15 La identificación fiable de las enfermedades infecciosas, p.ej. de una infección por virus, como por ejemplo VIH, VHB o VHC, es de especial interés para poder diagnosticar cuanto antes las personas afectadas. Generalmente, las determinaciones inmunológicas de anticuerpos contra VIH, VHB o VHC se efectúan mediante el formato de ensayo indirecto o mediante el formato puente. En estos casos, para detectar los anticuerpos se emplean casi siempre mezclas de varias proteínas o péptidos que llevan epítopos procedentes de la región nuclear y la envoltura del virus. Esta mezcla se inmoviliza sobre un soporte, es decir, una fase sólida. Dado que la clasificación como VIH-positivo es de gran importancia para los individuos y que los resultados falsamente positivos pueden tener consecuencias fatales, actualmente es preciso revisar en un ensayo de confirmación todos los resultados positivos obtenidos con esta determinación inmunológica en ensayos rutinarios. Como ensayo de confirmación se suele usar un método Western blot, en el que los componentes proteicos de un lisado vírico están aplicados sobre un soporte poroso. No obstante, en el caso del HCV es muy difícil cultivar el virus. Por tanto, en tal caso, como ensayo de confirmación, no se lleva a cabo ningún Western blot con lisado vírico, sino un RIBA (ensayo inmunoblot recombinante) del tipo dotblot, que comprende proteínas o péptidos recombinantes como reactivos de ensayo.

20 Un gran inconveniente de los ensayos rutinarios realizados actualmente es que, según el analito, se usan mezclas de 5 hasta 10 o más antígenos para la detección. Aunque los ensayos rutinarios se mejoran continuamente, todavía no se ha podido renunciar del todo a los ensayos de confirmación. Por ejemplo, en el ensayo Enzygnost[®] HIV (de Boehringer Mannheim) se usa una mezcla de unos 5 antígenos diferentes, que para la detección están biotinilados o marcados con digoxigenina. Aunque el ensayo funciona bien, implica el uso de mezclas con un número tan grande de antígenos diferentes, que la inmovilización o fijación de cada uno de ellos sobre la fase sólida impide alcanzar una concentración óptima para la detección. Con una mezcla de tantos componentes, la fase sólida no tiene bastante capacidad para fijar todos los antígenos en una concentración óptima. Además, el uso de una mezcla de antígenos para recubrir una superficie de ensayo tiene como consecuencia que los diferentes antígenos compiten por los sitios de fijación sobre la fase sólida y los distintos tamaños pueden producir distintas velocidades de difusión y diversos efectos estéricos. En el caso de una aplicación directa, se fijan p.ej. antígenos hidrófobos de manera preferente a la superficie de plástico, mientras que simultáneamente se expulsan antígenos más hidrófilos. En consecuencia, por un lado solo se obtienen resultados difícilmente reproducibles, y por otro, la concentración de ciertos epítopos de antígenos resulta tan pequeña, que no permite ninguna detección significativa.

25 Otra desventaja del uso de mezclas de antígenos en los ensayos rutinarios es que con la mezcla de diferentes antígenos aumenta claramente el riesgo de una mayor fijación inespecífica, lo cual aumenta a su vez los resultados falsamente positivos. Como consecuencia, el límite de exclusión en los ensayos rutinarios efectuados hasta ahora debe establecerse bastante alto y por tanto se pierde sensibilidad. Sobre todo en el método Western blot, el número de resultados falsamente positivos por fijación inespecífica aumenta debido a las proteínas extrañas presentes en el lisado vírico, de tal manera que para un resultado positivo se requieren al menos 2 bandas reactivas.

30 Se ha intentado mejorar aún más la sensibilidad de este método de detección. La patente EP 0 461 462 A1 describe un inmunoensayo para detectar anticuerpos víricos con la ayuda de un ensayo de tipo indirecto. En el inmunoensayo del tipo dotblot descrito en la patente EP 0 461 462 A1, en lugar de un lisado vírico usual se aplican, individualmente, proteínas recombinantes purificadas en áreas de ensayo discretas sobre un substrato poroso, obteniéndose un formato de ensayo que, gracias al uso de proteínas purificadas, es más sensible que un Western blot.

35 La patente EP 0 627 625 A1 se refiere a un método para detectar anticuerpos víricos en una muestra mediante el formato puente. En este caso también se trata de un RIBA (ensayo inmunoblot recombinante), en que se aplican varios antígenos de manera espacialmente separada sobre una fase sólida de un material poroso, haciendo hincapié en la necesidad de emplear una fase sólida de material poroso.

40 La patente EP 0 445 423 A2 se refiere a un método para detectar anticuerpos de HCV con la ayuda de varios epítopos de un antígeno HCV. En la patente EP 0 445 423 A2 también se describe un inmunoensayo para la

determinación de anticuerpos, en el cual se alcanza una mayor sensibilidad mediante el uso de ciertos antígenos mejorados.

5 Sin embargo, mediante este método descrito en el estado técnico, resulta difícil depositar una cantidad prefijada de reactivo sobre un soporte poroso de modo definido. Sobre todo cabe el riesgo de que los puntos individuales de ensayo depositados se entremezclen. Estos inconvenientes son más graves cuanto menores son los puntos aplicados, y por lo tanto este método no sirve para los sistemas de ensayo miniaturizados. Además, el manejo de tiras de papel es difícil de automatizar y por tanto es impensable como ensayo rutinario.

10 Por consiguiente uno de los objetivos consistía en proporcionar un método que permitiera eliminar, al menos en parte, las desventajas del estado técnico.

Dicho objetivo se resuelve mediante un método para detectar un analito en una muestra, el cual comprende las siguientes etapas:

- 15
- (a) preparación de una fase sólida que comprende un soporte no poroso y, como mínimo, dos áreas de ensayo separadas espacialmente, cada una de la cuales contiene distintos receptores inmovilizados, específicos del analito,
 - 20 (b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y al menos un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o capaz de unirse con un grupo generador de señal, y
 - (c) detección de la presencia o/y de la cantidad de analito mediante la determinación del grupo generador de señal sobre las áreas de ensayo.

25 El receptor inmovilizado, específico del analito, puede estar fijado tanto directa como indirectamente a la fase sólida mediante uno o más receptores. La fijación puede tener lugar por ejemplo mediante interacciones de tipo adsorbente o covalente, pero preferiblemente por interacciones de gran afinidad específica, p.ej. de tipo estreptavidina o avidina/ biotina o anticuerpo/antígeno.

30 El propio receptor libre, específico del analito, puede llevar un grupo generador de señal o ser capaz de unirse a un grupo generador de señal. En este caso, el reactivo detector consta de varios componentes.

35 En el caso de los analitos se puede tratar de una población homogénea o heterogénea, p.ej. una población heterogénea de anticuerpos, una mezcla de antígenos o una mezcla de antígenos y anticuerpos eventualmente diferentes, en la cual los antígenos y anticuerpos proceden de unos o varios virus o son inducidos por ellos. En caso de poblaciones heterogéneas de analitos, cada una de las áreas de ensayo fija una población parcial del analito investigado. Los receptores específicos del analito, respectivamente inmovilizados sobre una área de ensayo, son diferentes, es decir, se fijan preferentemente, conforme a la presente invención, a distintos epítomos de un analito homogéneo, como por ejemplo un antígeno, a distintos subtipos de analito, como por ejemplo subtipos de antígenos, o/y a distintos tipos de analitos, como por ejemplo diferentes antígenos o/y anticuerpos.

40 Sorprendentemente se observó que la sensibilidad del ensayo de detección, por ejemplo del ensayo de anticuerpos, podía mejorarse claramente con el empleo de ensayos de panel, en los cuales los distintos reactivos, p.ej. diferentes antígenos, se aplican como puntos individuales, es decir, sobre áreas de ensayo separadas. Mediante el análisis multiepítomo de la presente invención, es decir, la detección simultánea y separada de varias poblaciones parciales de un analito o de un virus como el VIH, se puede incrementar considerablemente la sensibilidad y fiabilidad de los ensayos de detección.

45 Si se obtiene un resultado de ensayo positivo sobre una o más áreas de ensayo, en algunos casos sobre al menos dos, ello se valora como presencia del analito en la muestra.

50 El empleo de un soporte no poroso permite aplicar los reactivos en áreas definidas. Esto es de especial importancia en los formatos de ensayo miniaturizados. Conforme a ello, las áreas de ensayo tienen preferentemente un diámetro de 0,01 hasta 1 mm, con mayor preferencia de 0,1 hasta 0,5 mm y sobre todo de 0,1 hasta 0,2 mm.

55 Se prefieren las fases sólidas con varias áreas de ensayo, conocidas también como sistemas matriciales. Este tipo de sistemas está descrito p.ej. por Ekins y Chu (Clin. Chem. 37 (1995) 1955-1967) y en la patentes US 5,432,099, 5,516,635 y 5,126,276.

60 La fase sólida usada consta de un soporte no poroso utilizable para métodos de detección. Este soporte no poroso puede ser de cualquier material que no sea poroso. Lleva preferentemente una superficie de plástico, de vidrio, de metal o de óxido metálico. Con especial preferencia, el soporte presenta una superficie de poliestireno. Sobre este soporte están dispuestas unas zonas espacialmente discretas (áreas de ensayo). Sobre estas áreas de ensayo hay reactivos depositados, por ejemplo receptores de fase sólida inmovilizados. Los reactivos se inmovilizan sobre las áreas de ensayo mediante métodos conocidos, p.ej. fijación directa por adsorción, unión covalente o mediante puentes afines, p.ej. estreptavidina/biotina, antígeno/anticuerpo o azúcar/lectina.

65

Sobre todo, es ventajoso que las áreas de ensayo espacialmente separadas estén cargadas con reactivos distintos. Con la aplicación individual de las distintas áreas de ensayo pueden elegirse para cada reactivo, por ejemplo para cada uno de los antígenos, la concentración óptima en la fase sólida y las condiciones óptimas de recubrimiento, p.ej. en forma de recetas tampón especiales. Ello permite aplicar cada receptor específico de analito, p.ej. cada antígeno, hasta la capacidad máxima de fijación de la superficie, mientras que, en los ensayos conocidos hasta la fecha, cada receptor, p.ej. cada antígeno, solo se podía unir con una parte de la capacidad de fijación disponible. Además, gracias a la aplicación separada de los distintos reactivos no hay ninguna competencia entre ellos, por ejemplo entre los antígenos, por los sitios de fijación sobre la fase sólida. Así pues, se prefiere fijar por cada área de ensayo solo un reactivo, capaz de unirse específicamente al analito investigado, de manera que cada área de ensayo solo contenga un único tipo de receptor específico de analito inmovilizado. Si es preciso, este reactivo puede diluirse con moléculas inertes diluyentes para formar una fase de fijación óptimamente homogénea. Las moléculas inertes diluyentes se fijan a la fase sólida, pero no interactúan con el analito ni con otros componentes de la muestra. Moléculas diluyentes adecuadas se describen por ejemplo en las patentes WO 92/10757 y EP 0 664 452 A2.

En el caso de áreas de ensayo sobre las que solo se ha fijado un reactivo, por ejemplo un antígeno, capaz de unirse con el analito, se comprobó que disminuía claramente la fijación inespecífica. Así, p.ej., al aplicar varios antígenos en forma de puntos individuales, no se observa ninguna fijación inespecífica medible, mientras que un punto de ensayo sobre el cual se ha aplicado una mezcla de varios antígenos muestra una fijación inespecífica claramente medible.

Según el método el analito se detecta mediante procedimientos conocidos, usando grupos marcadores adecuados, p.ej. grupos fluorescentes o quimioluminiscentes, marcadores radiactivos, enzimáticos o cromáticos y partículas de solución coloidal. Como alternativa, en fases sólidas adecuadas también puede comprobarse la interacción de componentes del medio detector con las áreas de ensayo, determinando el espesor de capa de las respectivas superficies, p.ej. mediante espectroscopia por resonancia de plasmones.

Para diferenciarse de zonas inertes de la fase sólida, las áreas de ensayo limitadas también pueden llevar un grupo marcador detectable e inespecífico del analito, que se puede detectar junto con el grupo del recubrimiento específico del analito, pero sin interferir con él. Un ejemplo de este tipo de marcador inespecífico del analito es un grupo fluorescente que emite a una longitud de onda de fluorescencia distinta de la de un grupo marcador específico del analito. Al igual que el receptor en la fase sólida, el grupo marcador inespecífico del analito se inmoviliza de modo preferente mediante un par de fijación de gran afinidad, p.ej. estreptavidina/biotina.

La sensibilidad también se puede incrementar utilizando un reactivo de detección universal. Previamente se puede usar para cada molécula de analito un reactivo de detección independiente, el cual se une a la molécula de analito y lleva un marcador, por ejemplo un enzima, un grupo fluorescente o partículas de látex fluorescentes. Sin embargo la combinación de varios reactivos de detección marcados suele aumentar mucho la concentración de marcadores, y por lo tanto es natural que crezca fuertemente la fijación inespecífica. Este problema se puede resolver utilizando un reactivo de detección universal. Se prefieren como tal las partículas de látex con marcaje fluorescente. Entonces, para fijar específicamente la molécula de analito se usa un primer receptor específico del analito que no lleva ningún grupo generador de señal. A este primer receptor específico del analito se fija un segundo receptor, universal y marcado, o sea un receptor que se puede unir a varios, preferentemente a todos los primeros receptores empleados, con independencia del analito. El segundo receptor se puede unir al grupo marcador por adsorción, por enlace covalente con grupos funcionales o mediante pares de fijación muy afines, p.ej. estreptavidina/biotina, antígeno/anticuerpo o azúcar/lectina. Se usa preferentemente el conocido sistema dig/anti-dig.

Otra desventaja del ensayo puente, que se realiza p.ej. como reacción de una etapa, es que el receptor de fase sólida (p.ej. VIH-gp41 biotinilado) y el receptor de detección libre (p.ej. VIH-gp41 digoxigenilado) deben estar en relación 1:1 para lograr una señal óptima. Esto es una desventaja, porque, debido a la limitada capacidad de fijación de la fase sólida, la concentración de cada receptor en la fase sólida suele ser inferior a la óptima y por lo tanto tampoco puede ser favorable para el receptor de detección.

Con este método los receptores de fase sólida pueden fijarse a ella en concentración óptima. Asimismo, el receptor de detección también puede ofrecerse en concentración óptima, porque, al contrario que los receptores marcados con enzimas, los receptores conjugados con digoxigenina o biotina tienen una tendencia insignificante a la fijación inespecífica. Estos reactivos se pueden usar en exceso, de manera que las imprecisiones en la adición del receptor no repercuten en la precisión del ensayo.

La presencia o/y la cantidad del analito en una muestra se puede determinar mediante la fijación específica del analito investigado al reactivo inmovilizado sobre el área de ensayo, p.ej. un receptor en fase sólida. La sensibilidad del método de detección se puede mejorar notablemente con la valoración combinada de las distintas áreas de ensayo, que contienen respectivamente diferentes reactivos capaces de fijar específicamente el analito, sobre todo, reduciendo los falsos resultados positivos y reconociendo los correctos sin ninguna duda. El método es de especial interés para registrar y eliminar fijaciones inespecíficas en los ensayos cualitativos con grandes exigencias de especificidad, como es el caso de los análisis de infecciones (p.ej. VIH).

5 Con el empleo de matrices, es decir fases sólidas que comprenden al menos dos, con preferencia al menos tres, con mayor preferencia al menos cinco, y hasta mil, sobre todo hasta cien áreas de ensayo espacialmente separadas, es posible establecer que, como mínimo, una de ellas constituya una área de control. Por tanto, el método comprende preferentemente el empleo de una fase sólida que además contenga al menos una, con preferencia dos y con mayor preferencia al menos cinco áreas de control. La integración de puntos de control en la fase sólida permite distinguir fácil y rápidamente los falsos resultados causados por fallos. Además de las áreas de ensayo específicas también se puede medir un sustrato específico de la muestra y definir por tanto un umbral específico de la misma. El uso de matrices de ensayo y de puntos de control permite rebajar dicho umbral. El valor umbral es un valor límite que se emplea en el método de ensayo, para poder distinguir entre valores positivos y negativos. Este valor umbral es de especial importancia para los métodos de ensayo relativos a las enfermedades infecciosas. El método permite detectar una diferencia positivo/negativo con una probabilidad de error considerablemente baja.

15 Cuando se usan varias áreas de ensayo - previstas respectivamente para determinar distintas moléculas de analito - ha dado a menudo buen resultado una definición del valor umbral, que sea específico del área de ensayo, para obtener una mayor especificidad (es decir una distinción correcta entre valores positivos y negativos) del ensayo a igual sensibilidad.

20 El método se puede emplear en cualquier proceso de detección, p.ej. en inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de azúcar/lectina y procedimientos análogos. El método de la presente invención también es esencialmente apropiado para determinar cualquier analito en una muestra. La detección del analito tiene lugar de modo especialmente preferente mediante interacciones específicas con uno o varios de los reactivos capaces de fijar el analito, es decir, receptores escogidos preferentemente entre proteínas, péptidos, anticuerpos, antígenos, haptenos y ácidos nucleicos.

25 Así como una ventaja esencial del método consiste en mejorar ante todo la sensibilidad de la detección de un analito individual, con la elección apropiada de las áreas de ensayo también se pueden determinar al mismo tiempo varios analitos con gran sensibilidad.

30 Se revela una fase sólida para detectar un analito en una muestra. Dicha fase sólida se caracteriza por constar de un soporte no poroso y de al menos dos áreas de ensayo separadas espacialmente, las cuales contienen a su vez reactivos diferentes con capacidad de fijación específica al analito investigado.

35 De modo preferente, las áreas de ensayo contienen respectivamente reactivos diferentes, que se fijan a distintos epítomos o/y sustratos de un analito o/y a distintos tipos de analito.

40 Para disponer el mayor número posible de áreas de ensayo sobre una fase sólida se emplean preferentemente formatos de ensayo miniaturizados. La distancia entre cada una de las áreas de ensayo se elige de modo que los reactivos aplicados no puedan entremezclarse. Normalmente basta que los bordes de las áreas de ensayo estén distanciados 0,05 hasta 5 mm. Entre las áreas de ensayo hay preferentemente una superficie inerte incapaz de unirse con el analito o con otros componentes de la muestra.

45 La fase sólida se puede usar en cualquier método de detección, p.ej. en inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de azúcar-lectina y análogos. Preferentemente se emplea en un inmunoensayo para detectar anticuerpos o/y antígenos.

50 La presente invención incluye también el uso de un kit de ensayo como el reivindicado, el cual consta de una fase sólida y de reactivos de detección marcados. Los reactivos de detección marcados son conocidos del especialista y contienen generalmente un grupo marcador y un grupo de fijación específica que permite la detección del analito. Como marcadores son adecuados p.ej. los grupos fluorescentes o quimioluminiscentes, las enzimas y las partículas radiactivas o de soluciones coloidales. El grupo de fijación específica puede ser capaz de unirse p.ej. al complejo del analito formado o en caso de formatos competitivos a otros componentes del sistema de detección. El kit de ensayo incluye preferentemente un conjugado universal como reactivo de detección, sobre todo, partículas de látex con un marcador fluorescente que pueden unirse con los receptores de detección específica del analito.

55 Otro problema de los ensayos rutinarios convencionales es que en una misma medición no se puede determinar simultáneamente un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno. Por este motivo en los llamados ensayos de combinación de VIH se determina simultáneamente por ejemplo el antígeno p24 y anticuerpos contra otros antígenos de VIH. Entonces en un ensayo de este tipo solo se pueden determinar anticuerpos contra otros antígenos de VIH, como por ejemplo gp41 gp120, mientras que la determinación de anticuerpos contra el p24 no es posible.

65 La patente US-PS-5,627,026 describe un método para la detección de un anticuerpo y un antígeno en una muestra biológica. Se describe como ejemplo un ensayo para determinar el antígeno FeLV y el anticuerpo de FIV. También según el método de la patente US-PS-5,627,026, en el mismo ensayo de determinación de un antígeno solo pueden detectarse anticuerpos dirigidos contra otros antígenos.

Por lo tanto otro objeto de la presente invención era proporcionar un método para determinar simultáneamente en una muestra un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno. Este objetivo se resuelve mediante con un método que consta de las siguientes etapas:

- 5 (a) preparación de una fase sólida sobre la cual, en una primera área de ensayo, se inmoviliza un receptor capaz de fijar el antígeno buscado y en una segunda área de ensayo, apartada de la primera, se inmoviliza un receptor capaz de fijar el anticuerpo buscado,
- (b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o que puede unirse a un grupo generador de señal, y
- 10 (c) detección de la presencia o/y cantidad del antígeno y del anticuerpo por determinación del grupo generador de señal en la fase sólida.

El antígeno se detecta preferentemente empleando un ensayo sándwich y el anticuerpo mediante un modelo de tipo puente, de valoración por retroceso o mediante un formato de ensayo indirecto.

15 El anticuerpo se detecta preferentemente mediante una valoración por retroceso. En este caso es ventajoso que al usar simultáneamente un ensayo sándwich para detectar el antígeno no puede haber ninguna influencia recíproca de moléculas detectoras, porque para detectar el antígeno y el anticuerpo se puede utilizar el mismo reactivo. Para detectar un antígeno - p.ej. VIH-p24 - mediante un ensayo sándwich, se inmoviliza por ejemplo un anticuerpo dirigido contra este antígeno sobre un área de ensayo. Luego, como receptor libre que sirva para la detección se puede usar un segundo anticuerpo, marcado directa o indirectamente, dirigido contra el antígeno, p.ej. un anticuerpo anti-p24 digoxigenilado. Para detectar el correspondiente anticuerpo dirigido contra el antígeno, p.ej. un anticuerpo anti-p24, mediante una valoración por retroceso, se inmoviliza sobre otra área de ensayo un antígeno capaz de fijarse al anticuerpo, p.ej. p24, o un fragmento del mismo. Como reactivo de detección también sirve el segundo anticuerpo marcado, dirigido contra el antígeno, p.ej. un anticuerpo anti-p24 digoxigenilado que compite con el analito – por ejemplo el anticuerpo anti-p24 natural presente en la muestra – por la fijación al antígeno inmovilizado. Así pues, para la detección simultánea preferida de un antígeno p24 y del anticuerpo anti-p24 dirigido contra el mismo se puede emplear respectivamente el mismo reactivo, por ejemplo un anticuerpo anti-p24 digoxigenilado.

30 Cuando el antígeno se detecta mediante un ensayo sándwich y el anticuerpo paralelamente mediante un ensayo tipo puente o indirecto, se deben emplear reactivos de ensayo especiales para excluir una influencia mutua entre los reactivos de detección. Para detectar un anticuerpo, p.ej. un anticuerpo anti-p24, mediante un ensayo indirecto se inmoviliza, por ejemplo, un antígeno específico del anticuerpo determinado, p.ej. p24, sobre un área de ensayo. Luego, para detectar el anticuerpo se usa un anticuerpo marcado que reconoce el anticuerpo buscado, pero no el antígeno inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo anti-IgG humana. Para la determinación paralela en el formato sándwich se puede usar en el lado de detección uno o más anticuerpos, preferiblemente monoclonales, cuyos sitios de fijación epitópicos sean conocidos. Al mismo tiempo, para la determinación del anticuerpo mediante el formato de ensayo indirecto o el formato puente no se puede emplear ningún antígeno nativo o recombinante que contenga epítomos capaces de fijarse con el anticuerpo detector, si no, se produce una reacción no deseada. En su lugar se deben utilizar determinados antígenos recombinantes o antígenos peptídicos sin estos sitios de fijación epitópicos, a los cuales no puede fijarse el o los anticuerpos detectores empleados.

45 El análisis multiepitópico con sistemas matriciales permite llevar a cabo una detección combinada de antígeno y anticuerpo para un antígeno determinado y un anticuerpo dirigido contra este antígeno determinado. Este método permite llenar el vacío diagnóstico existente en los procedimientos conocidos del estado técnico entre la primera aparición de un antígeno y la aparición desfasada de anticuerpos y catalogar muy pronto una muestra como positiva o negativa. Usualmente se toman muestras de pacientes, por lo que la sensibilidad de un ensayo está condicionada por el reconocimiento más temprano posible de las muestras positivas. En el caso de una infección, los distintos marcadores que la indican, por ejemplo los antígenos o los anticuerpos dirigidos contra ellos, aparecen a tiempos diferentes.

Además el método multiepitópico con una configuración matricial permite una distinción específica entre el ensayo del antígeno y el ensayo del anticuerpo, gracias a la disposición separada de las áreas de ensayo individuales. La ventaja del método se puede apreciar sobre todo en los ensayos de VIH. Un ejemplo preferido del método es la detección simultánea de un antígeno VIH y de anticuerpos dirigidos contra él, p.ej. del antígeno p24 y del respectivo anticuerpo anti-p24. En una infección por VIH aparecen primero antígenos p24. Éstos se pueden detectar con un ensayo de antígenos, pero no con un ensayo de anticuerpos. Tras la aparición de los antígenos se forman en el cuerpo anticuerpos contra estos antígenos. Sin embargo en los ensayos combinados convencionales no se puede unir el ensayo de antígenos p24 con el ensayo de anticuerpos anti-p24, sino más bien tiene lugar una combinación del ensayo de antígenos p24 con un ensayo de anticuerpos anti-gp41. Pero, como los anticuerpos anti-gp41 se pueden formar después que los anticuerpos anti-p24, en los métodos convencionales se pueden obtener resultados negativos falsos hasta la formación de los anticuerpos anti-gp41. En cambio el método de la presente invención es más seguro, porque también se pueden determinar los anticuerpos anti-p24.

65 El recubrimiento fijador de la primera área de ensayo, en la cual debe detectarse el antígeno, está formada con preferencia por anticuerpos inmovilizados que son específicos para epítomos del antígeno buscado. La estructura

matricial empleada preferentemente permite aplicar en áreas de ensayo separadas varios anticuerpos que son específicos de distintos subtipos del antígeno buscado. Los anticuerpos se eligen en función del antígeno que debe analizarse. Para el análisis de una infección vírica se ensayan preferentemente anticuerpos anti-VIH-II, anticuerpos anti-VHB o/y anticuerpos anti-VHC. De manera análoga el recubrimiento fijador de las otras áreas de ensayo, en las cuales debe detectarse un anticuerpo, contiene preferentemente antígenos específicos del anticuerpo buscado. En este caso también se pueden usar en principio antígenos adaptados al ensayo correspondiente, con preferencia antígenos o sus epítomos de VIH-I, VIH-II, VHB o/y VHC.

El método permite obtener resultados especialmente buenos con el uso de una fase sólida no porosa. Una fase sólida no porosa ofrece especiales ventajas al aplicar los reactivos de ensayo, pues permite una aplicación definida sin que las áreas de ensayo individuales se entremezclen. Además el uso de áreas de ensayo no porosas permite miniaturizar el formato de ensayo. En los formatos de ensayo miniaturizados se puede aplicar una serie de áreas de ensayo sobre una sola fase sólida no porosa.

La fijación de un antígeno o anticuerpo a las áreas de ensayo se detecta preferiblemente con el uso de anticuerpos marcados dirigidos contra el analito. Para detectar el antígeno en el formato sándwich se usa un anticuerpo marcado dirigido contra este antígeno. El mismo anticuerpo marcado también sirve para detectar el analito-anticuerpo en el formato competitivo, p.ej. en una valoración por retroceso. Por tanto la valoración espacialmente separada de cada área de ensayo permite detectar con un único reactivo detector tanto el antígeno como el anticuerpo específico de este antígeno, sin que ambos procesos de detección se entorpezcan mutuamente. Las sustancias apropiadas para marcar anticuerpos son conocidas del especialista y abarcan p.ej. grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes, marcadores radiactivos, marcadores enzimáticos, marcadores colorantes y partículas de sol. Se prefiere el uso de un reactivo detector universal, sobre todo de partículas de látex con marcadores fluorescentes, capaces de fijarse p.ej. a los receptores de detección.

Con el método se obtienen resultados especialmente buenos cuando los recubrimientos de fijación específica se aplican separadamente sobre las áreas de ensayo individuales. Ello permite aprovechar óptimamente la capacidad de fijación de cada área de ensayo y preparar unos recubrimientos fijadores óptimos. Si es preciso, los reactivos de fijación se pueden diluir con moléculas diluyentes para mejorar aún más la capacidad de fijación del recubrimiento. Son moléculas diluyentes adecuadas aquellas que no se fijan al analito buscado y tampoco interactúan o se fijan inespecíficamente a otros componentes de la muestra, lo cual daría falsos resultados positivos (véanse las patentes WO 92/10757, EP 0 664 452 A2). En cada área de ensayo el recubrimiento se forma con especial preferencia de un solo tipo de molécula capaz de fijación específica. En puntos de ensayo diferentes se aplican diversos reactivos capaces de fijarse al analito. De este modo puede incrementarse aún más la sensibilidad del método de la presente invención.

Se revela una fase sólida para la determinación simultánea de un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, que incluye al menos una primera área de ensayo y al menos una segunda área de ensayo y se caracteriza porque la primera área de ensayo presenta un recubrimiento de fijación específica con un antígeno y la segunda área de ensayo un recubrimiento de fijación específica con un anticuerpo dirigido contra este antígeno, de forma que los recubrimientos son homogéneos y solo contienen respectivamente un único tipo de reactivo fijador. Los recubrimientos se aplican uniformemente sobre las áreas de ensayo, es decir son homogéneos. Además del reactivo fijador, las áreas de ensayo pueden incluir moléculas diluyentes inertes que no pueden interactuar con el analito buscado ni con otros componentes de la muestra.

Aunque en principio se puede emplear cualquier material soporte, las áreas de ensayo de la fase sólida según la presente invención se aplican preferentemente sobre un soporte no poroso. Sobre todo el empleo de superficies no porosas permite miniaturizar el formato de ensayo y determinar al mismo tiempo múltiples áreas de ensayo.

La fase sólida es especialmente adecuada para un ensayo inmunológico destinado a la determinación simultánea de un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, lo cual permite mejorar todavía más la sensibilidad y la fiabilidad de los ensayos inmunológicos.

Se revela un kit de ensayo para la determinación simultánea de un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, el cual comprende la fase sólida y reactivos marcados para detectar antígenos y anticuerpos fijados a las áreas de ensayo. Los reactivos de detección adecuados son, por ejemplo, anticuerpos marcados con alguno de los grupos arriba citados.

Otro problema de los ensayos rutinarios disponibles hasta la fecha es que se mezclan todos los antígenos y anticuerpos necesarios para un ensayo, por ejemplo un ensayo de VIH, y se establece un valor límite óptimo para esta mezcla en el método de detección. Sin embargo, con el uso de un valor límite común para todos los parámetros dicho valor queda determinado y restringido por la fijación inespecífica del peor componente. Por consiguiente se revela un método para detectar un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- (a) preparación de una fase sólida que consta de un soporte y de al menos dos áreas de ensayo separadas espacialmente, las cuales contienen respectivamente receptores inmovilizados, distintos y específicos del analito,

(b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y al menos un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o que puede unirse a un grupo generador de señal, y

5 (c) detección de la presencia o/y cantidad del analito por determinación del grupo generador de señal en las áreas de ensayo, de tal manera que, si la señal es superior a un valor límite prefijado y específico del área de ensayo, se clasifica como positiva y, si es inferior a un valor límite prefijado y específico del área de ensayo, se clasifica como negativa.

10 Usando valores límite prefijados y específicos de cada una de las áreas de ensayo puede mejorarse claramente la especificidad del método de detección, manteniendo la sensibilidad elevada. El valor límite o valor umbral se calcula con las magnitudes señal de la muestra, fondo de la muestra y fondo de un control negativo. Un cálculo habitual del valor umbral (COI) se realiza por ejemplo según la fórmula:

$$\text{COI} = \text{señal}_{\text{muestra}} - \text{fondo}_{\text{muestra}}/n \times \text{fondo}_{\text{control negativo}}$$

15 Un valor usual para n es por ejemplo 2. El factor n, y por tanto el valor umbral, puede rebajarse para ciertas áreas de ensayo en las que se observan falsas muestras positivas y n puede ser un número comprendido entre 2 y 100, preferentemente entre 1 y 10. Se prefieren valores límite individuales para cada área de ensayo, lo cual significa que para las distintas áreas de ensayo se fijan diferentes valores límite o umbral, especialmente para al menos dos áreas de ensayo. Las formas de ejecución preferidas de este método aprovechan las características arriba descritas.

20 La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

25 1. Ensayo de anticuerpos anti-HIV por tecnología microspot con varias áreas de ensayo específicas del antígeno-

30 El microspot es una tecnología miniaturizada ultrasensible ideal para la determinación simultánea de varios parámetros en un solo proceso de medición. Para la determinación de los anticuerpos anti-VIH se aplican individualmente distintos antígenos VIH detectores, formando las denominadas "matrices" sobre un área de ensayo (spot) de un soporte de poliestireno, mediante un método de inyección de tinta. Para llevar a cabo el ensayo se pipetea 30 µl de muestra diluida con tampón de muestras en relación 1:1 sobre el soporte provisto de áreas de ensayo y se incuba durante 20 minutos agitando a temperatura ambiente. Tras aspirar la muestra y lavar con tampón de lavado se agregan 30 µl de solución reactiva 1 que contiene una mezcla de todos los antígenos VIH marcados con digoxigenina y se incuba otra vez durante 20 minutos agitando a temperatura ambiente. Tras aspirar la solución reactiva 1 y lavar con el tampón de lavado se agregan 30 µl de solución reactiva 2 con el reactivo detector. Como reactivo universal de detección se utilizan unas partículas de látex fluorescentes, de 100 nm de tamaño, que están recubiertas mediante unión covalente con un anticuerpo anti-digoxigenina.

40 Este reactivo de detección también se incuba durante 20 minutos agitando a temperatura ambiente y a continuación se aspira, se lava y se seca por aspiración. Las áreas de ensayo se irradian luego con un láser de He-Ne de 633 nm de longitud de onda y la fluorescencia se mide a 670 nm de longitud de onda con una cámara CCD.

45 La fase sólida contiene áreas de ensayo específicas con los siguientes antígenos inmovilizados:

- Polipéptido p24 recombinante
- Transcriptasa inversa recombinante (RT)
- Péptido gp41, 1
- Péptido gp41, 2

50 Como tampón de la muestra se usó un tampón Tris 50 mM de pH 7,6 con los siguientes aditivos: 0,05% de Tween 20, 0,5% de albúmina de suero bovino (RSA), 0,1% de IgG bovino, 0,01% de metilisotiazolona, 3% de peptona.

55 Como solución reactiva 1 se empleó el tampón de muestra arriba descrito, que contiene los siguientes antígenos específicos del ensayo:

- p24 recombinante, marcado con digoxigenina
- Transcriptasa inversa recombinante marcada con digoxigenina
- Péptido gp41, 1, marcado con digoxigenina
- 60 - Péptido gp41, 2, marcado con digoxigenina

Como solución reactiva 2 se empleó un tampón Tris 50 mM de pH 8,0 con los siguientes aditivos: 0,05% de Tween 20, 0,9% de NaCl, 0,5% de RSA, 0,1% de azida sódica y 0,01% de partículas de látex fluorescentes recubiertas de un anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina.

65

2. Comparación de un ensayo de anticuerpos anti-HIV en el formato de microspot con los métodos convencionales

5 En este ensayo se midieron muestras llamadas de seroconversión. Estas muestras son tomas sucesivas de diversas personas, cuyo resultado VIH-negativo en suero se convierte en VIH-positivo. Cuanto más sensible es un método, más pronto se puede detectar una señal de anticuerpo específico de VIH. Las muestras se midieron con el método (microspot) y, comparativamente, con un método conocido (Enzymun® de Boehringer Mannheim). Las sustancias específicas de VIH utilizadas para ello eran idénticas en ambos sistemas de ensayo, los cuales, por tanto, solo se
10 diferencian, sobre todo, en el análisis por puntos individuales separados. En la tabla siguiente se representan los índices del valor umbral (índice de valor umbral = $\frac{\text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}}{2 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}}$) para ambos métodos, comparados además con datos de Western blot:

Panel de seroconversión de la firma BBI*	Día de la toma	p24	RT	Péptido gp41, 1	Péptido gp41, 2	Western blot	Enzymun®
R	2ª toma	2	0,0	0,0	0,0	negativo	0,5
	3ª toma	7	22,2	0,0	0,0	indiferente	15,4
	4ª toma	13	17,4	2,6	4,4	positivo	36,0
AB	1ª toma	0	0,0	0,0	0,6	negativo	0,3
	2ª toma	28	0,0	0,0	0,4	negativo	0,7
	3ª toma	33	0,0	0,0	5,5	negativo	24,2
	4ª toma	35	0,8	0,2	6,0	positivo	26,7
	5ª toma	37	15,2	5,1	4,6	positivo	28,9
AD	5ª toma	21	0,0	0,0	0,0	negativo	0,3
	6ª toma	25	0,2	0,0	1,6	positivo	0,9
	7ª toma	28	14,1	0,3	11,1	positivo	24,5
AG	3ª toma	13	0,0	0,0	0,0	negativo	0,4
	4ª toma	27	0,0	0,0	0,0	negativo	0,6
	5ª toma	34	6,0	5,3	0,0	positivo	8,1
	6ª toma	50	6,1	5,4	0,0	positivo	3,1
	7ª toma	78	1,0	6,8	0,0	positivo	1,6
	8ª toma	163	1,5	5,3	0,0	positivo	0,6
AI	1ª toma	0	0,0	0,0	1,2	indiferente	0,8
	2ª toma	7	0,6	0,5	54,7	positivo	30,2
	3ª toma	11	1,1	0,7	18,8	positivo	30,2

* Boston Biomedica Inc.

15 Esta comparación demuestra que la repartición en puntos individuales, con sus respectivas concentraciones óptimas de antígenos, mejoraba claramente la sensibilidad en comparación con los ensayos conocidos. De los 5 paneles de seroconversión se diagnosticaron tempranamente 7 tomas como positivas. Esto corresponde, según el panel, a una detección más temprana de la infección por VIH de 3 hasta 7 días. En comparación con el Western blot también se alcanzó un claro aumento de la sensibilidad, con 6 tomas diagnosticadas más pronto.
20

3. Comparación de una determinación combinada del antígeno p24 de VIH y de anticuerpos anti-gp41 y anti-RT en el formato de microspot con los métodos convencionales

25 Para evaluar la sensibilidad se midieron de nuevo las llamadas muestras de seroconversión. La determinación se realizó con el método (microspot) y los datos obtenidos se compararon con los mejores ensayos anti-VIH entonces disponibles (véanse las fichas técnicas del fabricante de paneles de seroconversión, p.ej. de la firma BBI) o con el ensayo combinado Enzymun® de Boehringer Mannheim (determinación combinada del antígeno p24 y anticuerpos anti-VIH).

30 Para el formato microspot se emplearon las siguientes áreas de ensayo (preparadas como en el ejemplo 1) (puntos individuales):

- anticuerpo monoclonal anti-p24 A para determinar el antígeno p24 del VIH subtipo B
- anticuerpo monoclonal anti-p24 B para determinar el antígeno p24 del VIH subtipo B y O
- 35 - péptido gp41 1 para determinar anticuerpos contra gp41
- péptido gp41 2 para determinar anticuerpos contra gp41
- transcriptasa inversa recombinante (RT) para determinar anticuerpos contra RT

40 Las sustancias específicas de VIH empleadas en el ensayo microspot eran comparables con las utilizadas en el ensayo Enzymun®, de manera que ante todo el método microspot solo se distingue del método Enzymun® por el

ES 2 511 742 T3

análisis en puntos individuales separados. En la tabla siguiente figuran los índices umbral (véase la determinación del ejemplo 2) de ambos métodos y además están comparados con los ensayos anti-VIH más sensibles conocidos hasta la fecha.

Panel de seroconversión (de la firma BBI**)	AMC <p24> A	AMC <p24> B	RT	péptido gp41 1	péptido gp41 2	Ensayo anti-VIH más sensible	Enzymun Kombi
Q 1ª toma	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	negativo	0,30
2ª toma	24,4	48	0,0	0,0	0,0	negativo	0,66
3ª toma	246	435	0,0	0,0	0,0	negativo	3,47
4ª toma	nd	nd	nd	nd	nd	positivo	2,30
W 6ª toma	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	negativo	0,30
7ª toma	0,5	1,1	0,0	0,0	0,1	negativo	0,32
8ª toma	5,8	14,1	0,1	0,0	0,1	negativo	0,41
9ª toma	529	806	0,0	0,0	0,0	positivo	10,1
Z 2ª toma	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativo	0,31
3ª toma	20	25,5	0,1	0,0	0,1	negativo	0,61
4ª toma	226	262	0,0	0,0	0,0	negativo	2,96
5ª toma	0,9	1,1	3,7	82,6	277	positivo	18,0
AD 2ª toma	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	negativo	0,30
3ª toma	2,5	6,4	0,1	0,0	0,1	negativo	0,33
4ª toma	96,8	200	0,0	0,0	0,0	negativo	1,5
5ª toma	663	832	0,0	0,0	0,0	positivo	> 23,3
6ª toma	549	709	0,6	2,7	2,8	positivo	> 23,3
AF 3ª toma	0,1	0,6	0,2	0,0	0,2	negativo	0,31
4ª toma	0,4	1,7	0,0	0,0	0,02	negativo	0,30
5ª toma	2,1	4,6	0,02	0,0	0,0	negativo	0,34
6ª toma	31,2	61,6	0,1	2,9	204	positivo	18,0

5

** BBI Boston Biomedica Inc.

Esta comparación demuestra que la determinación combinada del antígeno p24 y de los anticuerpos de VIH se puede mejorar claramente mediante el formato de ensayo microspot en comparación con los métodos corrientes. El ensayo microspot combinado es varias veces más sensible que el ensayo combinado Enzymun[®], en el cual todos los antígenos y anticuerpos se hallan mezclados. En los cinco paneles de seroconversión investigados se detectaron más temprano nueve tomas positivas respecto al ensayo de anticuerpos más sensible e incluso seis tomas positivas respecto al ensayo combinado Enzymun[®].

10

4. Determinación combinada del antígeno p24 y de anticuerpos anti-p24 según el principio de valoración por retroceso

15

Para la determinación combinada del antígeno p24 y de los anticuerpos contra p24 en el mismo sistema matricial se realizó un ensayo de antígeno p24 en el formato sándwich y un ensayo de anticuerpos anti-p24 en el formato de valoración por retroceso.

20

Se prepararon matrices con los siguientes reactivos específicos de p24 en cada uno de los puntos individuales (véase ejemplo 1):

25

(a) Ensayo de panel con antígenos p24 y anticuerpos anti-p24:

(i) Ensayo de antígenos p24:

área de ensayo 1: anticuerpo monoclonal anti-p24 A fragmento fab', biotinilado (100 µg/ml)

área de ensayo 2: anticuerpo monoclonal anti-p24 B fragmento fab', biotinilado (100 µg/ml)

(ii) Ensayo de anti-p24 según el modelo de valoración por retroceso.

30

área de ensayo 3: antígeno p24 biotinilado (0,3 µg/ml)

(b) Panel comparativo con el ensayo de anticuerpos anti-p24 según el modelo puente:

antígeno p24 biotinilado (14 µg/ml)

Para llevar a cabo el ensayo se pipetearon en cada panel 30 µl de muestra diluida 1:1 con tampón de muestra y se incubaron 45 minutos, agitando a una temperatura de 37°C. Después de aspirar la muestra y lavar con tampón de lavado se añadieron 30 µl de solución reactiva 1 que contenía una mezcla de todos los antígenos de VIH marcados con digoxigenina y los anticuerpos de VIH, y se incubó 10 minutos, agitando a una temperatura de 37°C. Se usaron los siguientes reactivos específicos de p24:

35

40

(a) Ensayo de panel con antígenos p24 y anticuerpos anti-p24:

– anticuerpo monoclonal anti-p24 D fragmento F(ab')₂, biotinilado (500 µg/ml)

– anticuerpo monoclonal anti-p24 E fragmento F(ab')₂, biotinilado (500 µg/ml)

ES 2 511 742 T3

- (b) Panel comparativo con el ensayo de anticuerpos anti-p24 según el modelo puente:
 – antígeno p24 digoxigenilado (30 ng/ml)

5 Después de aspirar la solución reactiva 1 y lavar con tampón de lavado se añadieron 30 µl de solución reactiva 2 con reactivo de detección (véase ejemplo 1). Este reactivo de detección se incubó 5 minutos agitando a 37°C y a continuación se aspiró, se lavó y se secó.

10 El área de ensayo se irradió con un láser de He-Ne de 633 nm de longitud de onda y se midió la fluorescencia a una longitud de onda de 670 nm con un escáner de láser confocal.

Con ambos paneles se midieron 11 muestras negativas de VIH y 19 muestras positivas de VIH: en la tabla siguiente se indican los índices umbral (COI) de ambos formatos de ensayo.

Número de muestra	COI <p24> valoración por retroceso*	COI <p24> formato puente**
Control negativo	2412 Cts	93 Cts
Control positivo	1276 Cts	24651 Cts
Muestra negativa 145	1,39	0,3
Muestra negativa 196	1,54	0,2
Muestra negativa 122	1,43	0,1
Muestra negativa 160	1,41	0,2
Muestra negativa 141	1,28	0,2
Muestra negativa 168	1,58	0,2
Muestra negativa 222	1,38	0,2
Muestra negativa 280	1,42	0,2
Muestra negativa 232	1,32	0,2
Muestra negativa 201	1,54	0,3
Muestra negativa 211	1,33	0,2
Muestra positiva 154	0,31	534
Muestra positiva 132	0,47	537
Muestra positiva 130	0,42	547
Muestra positiva 138	0,46	473
Muestra positiva 163	0,47	591
Muestra positiva 176	0,39	505
Muestra positiva 204	0,39	531
Muestra positiva 167	0,39	588
Muestra positiva 221	0,79	351
Muestra positiva 174	0,30	506
Muestra positiva 285	0,43	506
Muestra positiva 150	0,76	422
Muestra positiva 179	0,58	596
Muestra positiva 236	0,55	573
Muestra positiva 337	0,60	491
Muestra positiva 203	0,35	573
Muestra positiva 147	0,72	610
Muestra positiva 285	0,47	584
Muestra positiva 289	0,30	496
*COI = $\frac{\text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}}{0,7 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}}$; COI > 1,0 = negativo		
**COI = $\frac{\text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}}{2 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}}$; COI > 1,0 = positivo		

15 Tanto las muestras negativas como positivas se pudieron detectar correctamente con el principio de valoración por retroceso. Mediante la combinación libre de interacciones de los ensayos de antígeno p24 y anticuerpos anti-p24 se pudieron detectar tempranamente las muestras de seroconversión y además se incrementó la seguridad en cuanto a detecciones de falsos negativos.

20 5. Mejora de la especificidad del ensayo mediante cálculo de valores umbral específicos de las áreas de ensayo

25 En los ensayos rutinarios disponibles hasta la fecha se mezclan todos los antígenos y anticuerpos necesarios para la determinación y se establece un valor umbral óptimo para esta mezcla. Este límite está marcado por la fijación inespecífica de la “peor” sustancia empleada. En cambio, con la tecnología microspot de la presente invención se puede calcular un valor umbral específico del área de ensayo y para cada sustancia empleada.

Con idéntico cálculo del valor umbral para cada área de ensayo ($\text{COI} = \frac{\text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}}{2 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}}$) y con el ensayo de VIH combinado (ejemplo 3) se pudo alcanzar la siguiente especificidad en 1264 muestras:

ES 2 511 742 T3

- Antígeno p24: 100%
- Ensayo de anticuerpos anti-VIH: 99,52% (seis determinaciones falsamente positivas)

5 Como que los falsos resultados positivos solo se dieron en las áreas de ensayo para el péptido gp41 2 y la transcriptasa inversa, los valores umbral para dichas áreas se rebajaron hasta los siguientes límites:

$$\begin{array}{ll} \text{Péptido gp41 2:} & (\text{COI} = \text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}/5 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}) \\ \text{RT:} & (\text{COI} = \text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}/3 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}) \end{array}$$

10 De este modo la especificidad del ensayo de HIV se pudo mejorar desde un 99,52% hasta el 99,92% (solo unas pocas determinaciones falsamente positivas). La sensibilidad del ensayo no resultó afectada, porque no se alteró el índice del valor umbral para el ensayo tan sensible del antígeno p24. Por tanto, se puede mejorar claramente la especificidad, manteniendo una sensibilidad elevada.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar simultáneamente un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno en una muestra, el cual comprende las siguientes etapas:
- (a) preparación de una fase sólida sobre la cual, en una primera área de ensayo, se inmoviliza un receptor capaz de fijar el antígeno buscado y en una segunda área de ensayo, apartada de la primera, se inmoviliza un receptor capaz de fijar el anticuerpo buscado,
- 10 (b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o que puede unirse a un grupo generador de señal, y
- (c) detección de la presencia o/y cantidad del antígeno y del anticuerpo por determinación del grupo generador de señal en la fase sólida.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el antígeno se detecta por medio de un ensayo sándwich.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo se detecta mediante un modelo de valoración por retroceso.
- 20 4. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo se detecta mediante un modelo tipo puente.
5. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo se detecta mediante un formato de ensayo indirecto.
- 25 6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el recubrimiento fijador de la primera área de ensayo está formado por anticuerpos inmovilizados específicos de un epítipo del antígeno buscado.
- 30 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque los anticuerpos que son específicos de los diversos subtipos del antígeno buscado se aplican en áreas de ensayo separadas.
8. Método según la reivindicación 6 o 7, caracterizado porque el anticuerpo se elige entre los de tipo vírico, en particular los anticuerpos anti-VIH-I, anti-VIH-II, anti-VHB y anti-VHC.
- 35 9. Método según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el recubrimiento fijador de la segunda área de ensayo está formado por antígenos que son específicos del anticuerpo buscado.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque los antígenos se eligen del grupo formado por VIH-I, VIH-II, VHB y VHC.
- 40 11. Método según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el antígeno buscado es VIH p24 y el anticuerpo buscado es anti-p24.
- 45 12. Método según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque se usa una fase sólida no porosa.
13. Método según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la detección se lleva a cabo con anticuerpos marcados dirigidos contra los analitos.
- 50 14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque el marcador se elige entre grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes, marcadores radiactivos, marcadores enzimáticos, marcadores colorantes y partículas de sol.
- 55 15. Método según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la detección se lleva a cabo con un reactivo universal, en particular con partículas de látex marcadas.
16. Método según una de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque la fase sólida se prepara aplicando directamente los recubrimientos fijadores específicos a cada área de ensayo por separado.
- 60 17. Método según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque el recubrimiento de las áreas de ensayo está formado respectivamente por un solo tipo de molécula fijadora.
- 65 18. Uso de una fase sólida según un método de las reivindicaciones 1 a 17 para la determinación simultánea en una muestra de un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, que comprende al menos una primera área de ensayo y una segunda área de ensayo, caracterizado porque la primera área de ensayo presenta un recubrimiento de fijación específica con un antígeno y la segunda área de ensayo un recubrimiento de fijación específica con un anticuerpo dirigido contra este antígeno.

ES 2 511 742 T3

19. Uso según la reivindicación 18, caracterizado porque los recubrimientos son homogéneos y solo contienen respectivamente un único tipo de reactivo fijador.
- 5 20. Uso según la reivindicación 18 o 19, caracterizado porque las áreas de ensayo están aplicadas sobre un soporte no poroso.
21. Uso según la reivindicación 20, caracterizado porque el soporte no poroso es de poliestireno.
- 10 22. Uso según una de las reivindicaciones 18 a 21, caracterizado porque cada área de ensayo tiene un diámetro de 0,01 hasta 1 mm.
- 15 23. Uso de un kit de ensayo para la determinación simultánea de un antígeno y de un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, incluyendo el empleo de una fase sólida según una de las reivindicaciones 18 a 22, así como reactivos de detección marcados.
24. Uso según la reivindicación 23, caracterizado porque el kit de ensayo incluye un reactivo de detección universal.