

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 309**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2007 E 07804639 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2049903**

54 Título: **Dispositivo de inmunocromatografía para el diagnóstico de enfermedades en una muestra**

30 Prioridad:

25.07.2006 WO PCT/IB2006/002021

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

03.02.2016

73 Titular/es:

**AUGURIX S.A. (100.0%)
Route de l'Île-au-Bois 1a
1870 Monthey, CH**

72 Inventor/es:

**BESSON DUVANEL, CÉCILE y
DUVANEL, THIERRY**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 558 309 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).

DISPOSITIVO DE INMUNOCROMATOGRAFÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES EN UNA MUESTRA

DESCRIPCIÓN

- 5 **Campo de la invención**
- La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, particularmente al diagnóstico biomédico. De manera más precisa, la invención refiere a un dispositivo de inmunocromatografía y a un método para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto.
- 10 **Antecedentes de la invención**
- La enfermedad celíaca (EC), que se considera como una enfermedad autoinmunitaria, es uno de los trastornos mediados por inmunidad de células T más comunes y. La EC se desencadena en individuos genéticamente susceptibles cuando ingieren componentes tóxicos (gluten) de cereales específicos, trigo, centeno y cebada. Los péptidos de gluten de la dieta atraviesan el epitelio intestinal e inician una serie de cascadas que fomentan mecanismos inflamatorios y la expansión clonal de células B que producen anticuerpos específicos contra péptidos de gluten (gliadina) y una respuesta autoinmunitaria contra la transglutaminasa tisular (Tgasa2), una enzima intracelular ubicua responsable de la desamidación del gluten [1, 2]. La intensa reacción inflamatoria local dentro del intestino delgado da como resultado en última instancia atrofia vellosa, hiperplasia de criptas e infiltración linfocítica masiva [3]. A continuación se produce malabsorción de micronutrientes (por ejemplo, vitaminas y minerales) y macronutrientes (por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, grasas).
- 15 Los pacientes con EC pueden clasificarse en tres categorías [4]: (a) sintomáticos o clásicos, (b) atípicos y (c) asintomáticos o silenciosos. La forma clásica se produce en la infancia y se manifiesta como incapacidad para desarrollarse con diarrea, distensión abdominal y retraso en el desarrollo. La falta de diagnóstico de la enfermedad puede conducir a una verdadera emergencia médica. La forma atípica de EC es más frecuente en adultos y puede presentar diversos síntomas no específicos (fatiga crónica, depresión, síndrome similar a fibromialgia, estomatitis aftosa, dolor óseo, dispepsia, reflujo gastroesofágico), lo que hace que el diagnóstico suponga un gran reto.
- 20 El tratamiento para la EC parece relativamente sencillo. Se requiere una dieta escrupulosa durante toda la vida libre de gluten. Para la mayoría de los pacientes, la dieta detendrá los síntomas, curará las heridas intestinales existentes y prevendrá el daño adicional. Las mejoras comienzan en el plazo de días del inicio de la dieta. El intestino delgado se cura habitualmente de manera completa en de 3 a 6 meses en niños y adultos más jóvenes y en el plazo de 2 años para adultos más mayores. Con el fin de permanecer bien, los pacientes celíacos deben evitar el gluten durante el resto de sus vidas. Esto puede ser complejo algunas veces puesto que el gluten se encuentra en la mayoría del grano, pasta, cereal y muchos alimentos procesados. A menudo se requiere la ayuda de un dietista al comienzo. Sin embargo, a medida que se reconoce cada vez más que la EC es un estado frecuente, cada vez hay más productos libres de gluten disponibles en la mayoría de las tiendas habituales.
- 25 El diagnóstico erróneo de EC puede tener consecuencias dramáticas a largo plazo. La malabsorción de calcio y vitamina D aumenta drásticamente el riesgo de osteoporosis y osteopenia en pacientes con EC. Se ha mostrado que otros trastornos autoinmunitarios están asociados con EC tales como diabetes mellitus de tipo I, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria entre las más frecuentes. Pero las complicaciones más temidas son el desarrollo de o bien un linfoma de células T asociado a enteropatía específica o bien un adenocarcinoma intestinal. Sin embargo, estudios demostraron que el mantenimiento de un estado libre de gluten a largo plazo reduce el riesgo de cáncer hasta el nivel de la población general [5]. El impacto de estas complicaciones es importante para el paciente, pero también en cuanto a los costes sanitarios. En un estudio italiano, se estimó que cada paciente con EC no diagnosticado asintomático costaba al sistema sanitario italiano hasta 8.700 euros al año debido al posible desarrollo de complicaciones [6]. A pesar del coste general del examen, se estimó un ahorro para cada paciente de hasta 7.200 euros. En un estudio similar en los EE.UU., cada caso diagnosticado de EC ahorraría hasta 7.400 dólares estadounidenses por año de vida ajustado por calidad [7].
- 30 Considerada tradicionalmente una enfermedad infantil rara, se ha reconocido ahora que la EC es un estado frecuente tanto en adultos como en niños. Hasta hace poco, los estudios sugerían que afectaba a una de cada 6.000 personas [8]. Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes han revelado que la EC se ha infradiagnosticado en gran medida y que la prevalencia en muchas poblaciones de adultos puede ser al menos de hasta 1:100 [9]. Además, la EC afecta a poblaciones en todo el mundo (por ejemplo, América del Norte y del Sur, Europa, Norte de África, Sur y Oeste de Asia, Australia) y no se restringe a personas de ascendencia europea como se pensaba inicialmente [10, 11, 12].
- 35 De manera interesante, la EC es también un estado asociado al antígeno leucocitario humano (HLA). Con pocas excepciones, la EC se limita a individuos predispuestos que expresan los haplotipos HLA-DQ2 (DQA1*0501/DQB1*0201), y los que expresan HLADQ8 (A1*0301/B1*0302) [11]. Otra anomalía común se ha vinculado al haplotipo HLA-DQ2, deficiencia de IgA selectiva (IgAD) [13]. IgAD es la inmunodeficiencia primaria más

común y se define por niveles de IgA en suero por debajo de 5 mg/dl con inmunidad mediada por células normal e IgG e IgM normales [14]. Se estima que hasta el 20% de los pacientes con EC tienen IgAD [15].

5 Los criterios de diagnóstico actuales para la EC se basan en las directrices revisadas propuestas por la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición [16]. Según estas directrices, se recomienda biopsia intestinal como método de referencia para descartar definitivamente el diagnóstico de EC. Sin embargo, este enfoque no puede usarse como procedimiento de examen. Recientemente, muchas instituciones están empleando pruebas serológicas (detección de anticuerpos anti-gliadina, IgA anti-endomisio e IgA anti-TGasa2) como herramientas de examen primarias. Se ha determinado que los autoanticuerpos frente a TGasa2 son los anticuerpos más frecuentes asociados con EC tal como se describió en una técnica previa [17]. Los inmunoensayos comercializados basados en TGasa2 tienen sensibilidades superiores al 90% y especificidades de más del 95% [18]. Sin embargo, estos análisis se basan en tecnologías de o bien ELISA o bien inmunofluorescencia que requieren ambos laboratorios bien equipados y personal cualificado no siempre disponibles en todo el mundo así como la repetición de los análisis para una única muestra biológica para identificar diferentes marcadores serológicos.

15 La solicitud de patente internacional WO 2005/082254 [a nombre de Eticon, EE.UU.] dio a conocer dos invenciones separadas. Una de ellas se refiere a un tapón de diagnóstico para una muestra líquida. El tapón de diagnóstico comprende una zona de reacción con resto reactivo que reacciona con un analito y una zona de detección con un resto detector. La segunda parte de la invención también se refiere a un aparato de prueba de diagnóstico que comprende: un eje que tiene un primer extremo y un segundo extremo; un hisopo o un punzón de biopsia montado sobre el primer extremo de un eje; y un tapón para ajustar sobre el primer extremo del eje, conteniendo dicho tapón al menos un reactivo de prueba de diagnóstico; en el que el eje comprende al menos un elemento de acoplamiento de tapón ubicado próximo al primer extremo, extendiéndose dicho elemento radialmente hacia fuera del hisopo o el punzón de biopsia para su acoplamiento con el tapón para retener el tapón sobre el eje. La configuración del tapón dado a conocer en este documento es cerrada en comparación con la presente invención. Este documento no da a conocer un dispositivo de inmunocromatografía y un método en el que la difusión de la muestra biológica a través de los lechos de conjugado se lleve a cabo en al menos tres zonas de ensayo de los lechos de prueba.

30 Se han descrito anteriormente cuatro ensayos inmunocromatográficos de una etapa en el documento WO 2005/082254 [a nombre de Eticon Inc, EE.UU.], la solicitud de patente internacional WO95/04280 [a nombre de Quidel Corp, EE.UU.], la patente europea n.º 1164375 [a nombre de CT Genetica Biotech] y la solicitud de patente internacional WO2004/016065 [a nombre del Consejo Superior Investigación *et al.*].

35 La solicitud de patente internacional WO95/04280 [a nombre de Quidel Corp, EE.UU.] da a conocer un método de una etapa de detección de analitos en una muestra que requiere extracción antes de la detección usando el dispositivo de prueba. Sin embargo, este documento no da a conocer un dispositivo en el que el lecho de muestra esté adaptado para dirigir al menos parte de dicha muestra biológica de un sujeto a través de lechos de conjugado en al menos tres zonas de ensayo.

40 La patente europea n.º 1164375 se basa en la detección de anticuerpos contra TGasa2 sólo ya que el nivel de IgA total no se detecta simultáneamente con la detección de anticuerpos contra TGasa2 (con una sensibilidad de anticuerpos de clase IgA contra TGasa2 y con una sensibilidad de anticuerpos de clase IgG contra TGasa2) en la muestra biológica.

45 El documento WO2004/016065 combina la detección de anticuerpos contra tanto TGasa2 como gliadina. Sin embargo, se ha encontrado que los anticuerpos anti-gliadina son mucho menos precisos que contra TGasa2 y por tanto la Sociedad Norteamericana de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición ya no recomienda que se sometan a prueba [21]. También se ha propuesto en Lahteenoja *et al.*, que IgA o IgG salivales dirigidos contra anticuerpos anti-gliadina no son útiles para el diagnóstico o seguimiento de pacientes con enfermedad celíaca [35].

50 Los pacientes con EC con IgAD no tendrán niveles elevados de manera anómala de IgA contra TGasa2. Esto ha conducido al uso de ensayos separados para IgA total y pruebas para anticuerpos de clase IgG contra TGasa2 [22]. Sin embargo, las estimaciones de la sensibilidad de anticuerpos de clase IgG solos sugieren que estas pruebas tienen malas sensibilidades de alrededor del 40% [23].

55 Adicionalmente, se sabe a partir del resumen de Jurjus *et al.* [34] dado a conocer durante la reunión de 2005 de biología experimental (San Diego - 31 de marzo a 6 de abril de 2005) que las pruebas de saliva podrían usarse de manera segura como modalidad de monitorización y diagnóstico no invasiva de la enfermedad celíaca excepto con pacientes con deficiencia de IgA.

60 A pesar de la divulgación de las patentes y solicitudes de patente anteriores, sigue habiendo la necesidad de desarrollar un método de examen de una etapa universal, fácil de realizar de manera rápida y precisa, para detectar simultáneamente la presencia de IgA total y anticuerpos contra TGasa2 (IgA e IgG) en poblaciones con EC en riesgo entre las que se encuentran las que tienen IgAD.

65 Este objeto se ha logrado proporcionando un dispositivo de inmunocromatografía para determinar la presencia de un

analito de unión en una muestra biológica de un sujeto, que comprende un sitio de aplicación de muestra para recibir dicha muestra biológica, lechos de conjugado que permiten que dicho analito de unión presente en dicha muestra biológica se una a un agente marcado, y lechos de prueba que comprenden zonas de ensayo, en el que el lecho de muestra está adaptado para dirigir al menos parte de dicha muestra biológica de un sujeto a través de dichos lechos de conjugado a al menos tres de dichas zonas de ensayo.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo de inmunocromatografía para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto para detectar simultáneamente la presencia de IgA total y anticuerpos contra TGasa2 en poblaciones con enfermedad celíaca en riesgo entre las que se encuentran las que tienen deficiencia de IgA, siendo dicho analito de unión una inmunoglobulina seleccionada del grupo que comprende una IgA, una sIgA e IgG, o una combinación de las mismas, que comprende un sitio de aplicación de muestra para recibir dicha muestra biológica, lechos de conjugado que permiten que dicho analito de unión presente en dicha muestra biológica se una a un agente marcado, y lechos de prueba que comprenden zonas de ensayo, en el que

i) se impregna un primer lecho de conjugado con un anticuerpo anti-IgA humana marcado y está en comunicación con un primer lecho de prueba, estando recubierto dicho primer lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con anticuerpo anti-IgA humana o una parte de unión del mismo, y

ii) se impregna un segundo lecho de conjugado con un anticuerpo anti-IgG humana marcado y está en comunicación con un segundo lecho de prueba, estando recubierto dicho segundo lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con anticuerpo anti-IgG humana, una proteína ubicua o partes de unión de los mismos,

y en el que el sitio de aplicación de muestra está adaptado para dirigir al menos parte de dicha muestra biológica de un sujeto a través de dichos lechos de conjugado a al menos tres zonas de ensayo de dichos lechos de prueba y al menos uno de dichos lechos de prueba comprende dos zonas de ensayo.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto para detectar simultáneamente la presencia de IgA total y anticuerpos contra TGasa2 en poblaciones con enfermedad celíaca en riesgo entre las que se encuentran las que tienen deficiencia de IgA, que comprende las etapas de

- a) proporcionar el dispositivo de inmunocromatografía de cualquiera de las reivindicaciones 1-8,
 - b) recoger la muestra biológica,
 - c) pretratar dicha muestra biológica en un tampón de pretratamiento,
 - d) poner en contacto la muestra biológica pretratada de la etapa c) con el lecho de muestra de dicho dispositivo de inmunocromatografía, permitiendo de ese modo que dicha muestra biológica pretratada difunda lateralmente a al menos tres zonas de ensayo de dichos lechos de prueba,
 - e) ejecutar un ensayo de flujo lateral permitiendo de ese modo que la muestra fluya a través del lecho de muestra hacia los lechos de conjugado y luego hacia los lechos de prueba, en el que dicho analito de unión, que es una inmunoglobulina seleccionada del grupo que comprende una IgA, una sIgA e IgG, o una combinación de las mismas, si está presente en dicha muestra biológica, entra en contacto en primer lugar con anticuerpo o bien anti-IgA humana o bien anti-IgG humana de modo que se forman complejos con dicho anticuerpo anti-IgA humana o anti-IgG humana y en el que dichos complejos entran en contacto además con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma,
 - f) permitir el desarrollo de una respuesta y detectar la presencia del marcador presente sobre los complejos,
- interpretar la respuesta para indicar la presencia de dicho analito de unión en dicha muestra biológica.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar un kit para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo dicho kit el dispositivo de inmunocromatografía de la invención, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

Descripción de las figuras

La figura 1A muestra una vista en perspectiva externa de una realización preferida del dispositivo de prueba.

La figura 1B muestra una vista en perspectiva lateral de una realización.

La figura 2 muestra las diversas interpretaciones de la prueba según los resultados visuales.

La figura 3A muestra una vista en perspectiva externa de una segunda realización del dispositivo de prueba.

La figura 3B detalla una vista en perspectiva lateral de una segunda realización del dispositivo de prueba.

La figura 4A muestra el efecto de aumentar la concentración de mucolítico y reducir el tampón de pretratamiento sobre muestras de saliva.

La figura 4B detalla los niveles de IgA anti-TGasa2 en suero, saliva completa no tratada, saliva completa tratada de pacientes con EC no tratada, con mal cumplimiento de la dieta, con buen cumplimiento de la dieta y de individuos control sanos tal como se comenta en el ejemplo 4.

La figura 5 representa los niveles de IgA anti-TGasa2 en suero, saliva completa no tratada, saliva completa tratada de pacientes con EC no tratada, con buen cumplimiento de la dieta y de individuos control sanos.

La figura 6A muestra una vista en perspectiva externa (parte superior) de la tercera realización preferida del dispositivo de prueba.

La figura 6B muestra una vista en perspectiva interna (parte inferior) de la tercera realización preferida del dispositivo de prueba.

La figura 7 muestra una vista en perspectiva interna (parte superior) de la tercera realización preferida del dispositivo de prueba.

Otros objetos y ventajas resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la descripción detallada que sigue, que se realiza con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos, y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a dispositivo de inmunocromatografía para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto para detectar simultáneamente la presencia de IgA total y anticuerpos contra TGasa2 en poblaciones con enfermedad celíaca en riesgo entre las que se encuentran las que tienen deficiencia de IgA, siendo dicho analito de unión una inmunoglobulina seleccionada del grupo que comprende una IgA, una sIgA e IgG, o una combinación de las mismas, que comprende un sitio de aplicación de muestra para recibir dicha muestra biológica, lechos de conjugado que permiten que dicho analito de unión presente en dicha muestra biológica se una a un agente marcado, y lechos de prueba que comprenden zonas de ensayo, en el que

i) se impregna un primer lecho de conjugado con un anticuerpo anti-IgA humana marcado y está en comunicación con un primer lecho de prueba, estando recubierto dicho primer lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con anticuerpo anti-IgA humana o una parte de unión del mismo, y

ii) se impregna un segundo lecho de conjugado con un anticuerpo anti-IgG humana marcado y está en comunicación con un segundo lecho de prueba, estando recubierto dicho segundo lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con anticuerpo anti-IgG humana, una proteína ubicua o partes de unión de los mismos,

y en el que el sitio de aplicación de muestra está adaptado para dirigir al menos parte de dicha muestra biológica de un sujeto a través de dichos lechos de conjugado a al menos tres zonas de ensayo de dichos lechos de prueba y al menos uno de dichos lechos de prueba comprende dos zonas de ensayo.

“Un” o “una” significa “al menos uno” o “uno o más”.

“Dispositivo de inmunocromatografía” se refiere habitualmente a un ensayo de flujo lateral inmunológico basado en membrana que permite la detección visual de un analito de unión en muestras líquidas.

Un “analito de unión” tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia tal como un producto químico o un constituyente biológico que está sometándose a análisis. Generalmente, el analito puede ser un ligando o un agente de unión. Habitualmente, el analito de unión es una inmunoglobulina (Ig). Preferiblemente, la inmunoglobulina se selecciona del grupo que comprende una IgA, una IgA secretora o una IgG o una combinación de las mismas. Lo más preferiblemente, el analito de unión es una IgA y/o una IgG.

Normalmente, el dispositivo de inmunocromatografía de la invención comprende un sitio de aplicación de muestra,

lechos de conjugado y lechos de prueba, comprendiendo dichos lechos de prueba zonas de ensayo.

El "sitio de aplicación de muestra" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región dedicada para recibir la muestra biológica del sujeto de la invención.

5 Preferiblemente, el sitio de aplicación de muestra comprende al menos un lecho de muestra. Un "lecho de muestra" puede recibir una muestra biológica y eliminar por filtración, si es necesario, cualquier materia particulada grande en la muestra biológica y mantener la muestra biológica de modo que pueda difundir lentamente al ensayo. El lecho de muestra está en contacto de flujo lateral con los lechos de conjugado. Esto podría ser o bien un solapamiento o bien 10 una conexión de extremo a extremo. El lecho de muestra está compuesto habitualmente por material poroso tal como celulosa, fibra de vidrio, fibra de vidrio unida y malla tejida. Preferiblemente, la región de lecho de muestra está compuesta por celulosa. Alternativamente, el lecho de muestra se impregna con tampón para neutralizar los reactivos de extracción durante el ensayo de flujo lateral.

15 El término "flujo lateral" se refiere a un flujo de líquido en el que todos los componentes disueltos o dispersados del líquido se transportan a velocidades sustancialmente iguales y con un flujo relativamente no alterado lateralmente a través del material, en contraposición a una retención preferente de uno o más componentes tal como se produciría, por ejemplo, en materiales porosos que pueden adsorber o empaparse de uno o más componentes.

20 Tal como se usan en el presente documento, los términos "material poroso" o "membrana porosa" se refieren a cualquier material que pueda proporcionar flujo lateral. Esto incluiría material tal como nitrocelulosa, combinaciones de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel no tratado, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo o nailon. Un experto en la técnica tendrá conocimiento de otros materiales porosos que permiten un flujo lateral.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, para deportes o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, monos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

30 Habitualmente, la muestra biológica de la invención se selecciona del grupo que comprende sangre completa, suero, plasma, saliva, orina, tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo. Preferiblemente, la muestra biológica es saliva.

35 El dispositivo de inmunocromatografía de la invención comprende además lechos de conjugado que permiten que dicho analito de unión presente en la muestra biológica se una a un agente marcado. Habitualmente, el lecho de conjugado está en contacto de flujo lateral con el lecho de muestra. Esto podría ser o bien mediante solapamiento o bien mediante una conexión de extremo a extremo. Alternativamente, el lecho de conjugado puede estar en la misma membrana porosa que el lecho de muestra. El lecho de conjugado está compuesto habitualmente por material poroso tal como celulosa, fibra de vidrio, fibra de vidrio unida y malla tejida. Preferiblemente, la región de 40 lecho de conjugado está compuesta por celulosa. Preferiblemente también, los lechos de conjugado se impregnan, o se asocian, con dicho agente marcado. Alternativamente, el agente marcado está unido a una microesfera. Un ejemplo de tal microesfera marcada es una microesfera de poliestireno teñida.

45 Habitualmente, el agente marcado es un anticuerpo monoclonal o policlonal. Preferiblemente, se selecciona del grupo que comprende anticuerpo anti-IgA humana, anticuerpo anti-IgA secretora humana y anticuerpo anti-IgG humana. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención que el agente marcado pueda ser cualquier molécula con afinidad por un analito de unión diana, incluyendo moléculas que pueden unirse a antígenos, proteínas, ácidos nucleicos, células, orgánulos subcelulares, y otras moléculas biológicas. Por ejemplo, el agente marcado puede derivarse de preparaciones de anticuerpos policlonales o monoclonales, puede ser un anticuerpo humano o puede ser un anticuerpo híbrido o quimérico, tal como un anticuerpo humanizado, un anticuerpo alterado, fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(ab), fragmentos Fv, un anticuerpo de un solo dominio, un constructo de fragmento de anticuerpo dimérico o trimérico, un minicuerpo o fragmentos funcionales de los mismos que se unen al analito de unión de interés. Se producen anticuerpos usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Además, el agente marcado puede ser un receptor para una hormona específica o cualquier otra proteína con afinidades de 55 unión específicas.

Unida al agente marcado, de manera o bien covalente o bien no covalente, está una sustancia o partícula que puede producir una señal (un marcador) detectada visualmente. Tales partículas usadas como reactivos de marcaje pueden ser cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, partículas metálicas y no metálicas coloidales, 60 partículas de colorante, enzimas o sustratos, polímeros orgánicos, partículas de látex, liposomas con sustancias que producen señales y similares.

Alternativamente, el dispositivo inmunocromatográfico de la invención puede establecerse como un diseño competitivo en el que el agente marcado se conjuga con una cantidad conocida de analito de unión y se captura por medio de un anticuerpo u otro compuesto con afinidad específica por el analito de unión.

65

Una vez que el agente marcado ha reconocido y se ha unido al analito de unión, se forma un complejo entre estas dos entidades.

5 Cada lecho de conjugado del dispositivo de inmunocromatografía de la invención está en comunicación con al menos un lecho de prueba. El lecho de conjugado y el lecho de prueba pueden estar presentes sobre una única membrana porosa, o pueden comprender al menos dos membranas porosas separadas en contacto de flujo lateral. El “lecho de prueba” de la invención es una membrana compuesta por material poroso que comprende un agente de captura recubierto en la zona de prueba. Preferiblemente, el agente de captura se aplica y se seca sobre el sustrato que compone el lecho de prueba. El agente de captura no se ve afectado por el flujo lateral de la muestra biológica debido a la inmovilización en el material poroso. El agente de captura puede “capturar” el complejo formado entre el analito de unión y el agente marcado cuando el complejo presente en la muestra biológica fluye por el agente de captura recubierto y lo inmoviliza.

15 Tal como se usa en el presente documento, “en comunicación” significa que los diferentes lechos están en contacto entre sí o bien mediante solapamiento, continuación o bien mediante conexión de extremo a extremo para garantizar que el flujo difunda por todo el dispositivo inmunocromatográfico de la invención.

20 Habitualmente, el lecho de prueba de la invención comprende zonas de ensayo. Tal como se usa en el presente documento, “una zona de ensayo” se refiere a una zona que delimita una región sobre el lecho de prueba donde se aplica al menos un agente de captura y se visualiza sobre el sustrato que compone el lecho de prueba. Habitualmente, la zona de ensayo puede observarse a través de, en el caso de que el dispositivo comprenda una cubierta de plástico, una ventana colocada sobre dicha cubierta de plástico.

25 Preferiblemente, uno de dichos lechos de prueba de la invención comprende dos zonas de ensayo o, alternativamente, cada uno de dichos lechos de prueba comprende una zona de ensayo.

30 El dispositivo de inmunocromatografía de la invención se caracteriza porque el sitio de aplicación de muestra está adaptado para dirigir al menos parte de dicha muestra biológica de un sujeto a través de dichos lechos de conjugado a al menos tres zonas de ensayo de dichos lechos de prueba. Esto se permite por el hecho de que el sitio de aplicación de muestra tiene una configuración que ayuda a la difusión de la muestra biológica, por ejemplo poniéndose en contacto estrecho con los lechos de conjugado.

35 El número de zonas de ensayo disponibles en el dispositivo de inmunocromatografía está comprendido entre 3 y 12, preferiblemente entre 4 y 10, más preferiblemente entre 4 y 8. El límite inferior de zonas de ensayo se ha determinado del orden de 3 según el ejemplo 1 que ilustra una realización preferida. En este caso, una primera zona (15) de ensayo revela la IgA total en la muestra biológica, una segunda zona (16) de ensayo revela la presencia de IgA contra TGasa2 mientras que una tercera zona (17) de ensayo revela la presencia de IgG contra TGasa2. Sorprendentemente, los solicitantes han mostrado que estas tres zonas de ensayo son obligatorias, en el caso de que la enfermedad que va a detectarse sea EC, para detectar EC en poblaciones en riesgo entre las que se encuentran las que tienen IgAD. Preferiblemente, el dispositivo de inmunocromatografía de la invención comprende una zona de ensayo adicional que corresponde a un control interno que sirve para validar el ensayo.

45 En referencia en más detalle a las figuras 1A y 1B, el lecho (6) de muestra del dispositivo de inmunocromatografía de la invención tiene una conformación en cruz y está en contacto mediante solapamiento con los lechos (7) de conjugado dentro de los 4 carriles (10), (11), (12) y (13). Cada lecho (7) de conjugado se solapa parcialmente con un lecho (8) de prueba. Las zonas de ensayo corresponden a las 4 regiones (14), (15), (16) y (17) representadas en la figura 2. Un material de plástico cubre el material poroso del dispositivo inmunocromatográfico.

50 Otra realización preferida se representa en las figuras 3A y 3B. En este caso específico, el lecho (19) de muestra tiene una conformación en U y se solapa con dos lechos (22, 23) de conjugado. Cada uno de los lechos (22, 23) de conjugado se solapa con un lecho (24, 25) de prueba. Estos lechos (24, 25) de prueba comprenden cada uno una zona (24', 24", 25', 25") de ensayo que puede observarse a través de, por ejemplo, una ventana colocada sobre la cubierta de plástico.

55 En una tercera realización preferida representada en las figuras 6 y 7, el sitio de aplicación de muestra también está descentrado con respecto a los lechos de muestra. Opcionalmente, este sitio de aplicación de muestra puede funcionar también como cámara de pretratamiento donde la muestra biológica entra en contacto con una disolución de pretratamiento.

60 Una vez aplicada la muestra biológica al sitio de aplicación de muestra, entonces fluye suavemente a través de un canal desde el sitio de aplicación de muestra hacia un receptáculo de muestra. Habitualmente, el movimiento de flujo de la muestra biológica está provocado por ejemplo por fuerzas gravitacionales o por difusión suave. Para evitar el desbordamiento, el dispositivo puede contener una ventana (31) para un flujo de aire. Entonces, los lechos de muestra entran en contacto con la muestra biológica mediante inmersión en el receptáculo de muestra. 65 Preferiblemente, cada uno de los lechos de muestra está montado sobre un carril (35, 36, 37) que mantiene el lecho de muestra en el receptáculo de muestra (28). Adicionalmente, hay medios, tales como tres paredes, véase la figura

7 (41), que garantizan que todos los lechos de muestra se sumergen en la muestra biológica. Cada lecho de muestra está entonces en comunicación con al menos un lecho de conjugado. Preferiblemente hay también paredes (42, 43, 44) que mantienen la presión en la superficie de contacto entre los componentes de cada una de las tiras de prueba de flujo lateral. El carril está habitualmente en una posición horizontal o, preferiblemente inclinado ligeramente con un ángulo de inclinación de entre 0-20°, preferiblemente una inclinación de 10°, que garantiza que no haya sobredesbordamiento de las tiras de prueba.

El lecho de conjugado y el lecho de muestra pueden estar presentes sobre una única membrana porosa, o pueden comprender al menos dos membranas porosas separadas en contacto de flujo lateral. Habitualmente, los diferentes lechos están en contacto entre sí o bien mediante solapamiento o bien mediante conexión de extremo a extremo para garantizar que el flujo difunda por todo el dispositivo inmunocromatográfico de la invención.

Habitualmente, un material de plástico cubre el material poroso de este dispositivo inmunocromatográfico. Cada lecho de prueba, que está en contacto con el lecho de conjugado o bien mediante solapamiento o bien mediante conexión de extremo a extremo también está montado sobre un carril (35, 36, 37) y comprende cada uno una zona de ensayo que puede observarse a través de, por ejemplo, una ventana colocada sobre la cubierta (32, 33, 34) de plástico. La figura 7 representa un ejemplo de esta tercera realización preferida que comprende tres carriles (35, 36, 37) comprendiendo cada uno una zona (32, 33, 34) de ensayo.

En el ejemplo de una realización preferida, el dispositivo comprende 3 carriles (35, 36, 37) dispuestos alrededor del centro de un círculo como los radios de una rueda en el que el centro constituye un receptáculo (28) de muestra. El sitio (38) de aplicación de muestra está descentrado con respecto a los carriles y está unido al receptáculo de muestra a través de un pequeño canal (39). El sitio de aplicación de muestra puede estar diseñado (30) para adaptarse a un dispositivo colector de saliva tal como Omni-SAL®.

Sin embargo, también está previsto tener un dispositivo con sólo dos carriles o más de tres y que comprende tres o más zonas de ensayo.

Este dispositivo presenta varias ventajas de fabricación tales como

- facilidad para ensamblar las tiras de prueba dentro del dispositivo,
- la etapa de pretratamiento de muestras puede realizarse dentro del dispositivo y
- no hay riesgo de que la tira de prueba se desborde mientras se aplica la muestra biológica.

Preferiblemente, al menos un lecho de prueba del dispositivo de inmunocromatografía de la invención es un lecho de control. Este lecho de control sirve para validar el ensayo y comprende una zona de prueba que comprende un agente de captura inmóvil que actúa como control interno. Habitualmente, el agente de captura que está recubierto en la zona de prueba de dicho lecho de control reconocerá un complejo formado entre el agente marcado y un analito de unión que está presente de manera ubicua en la muestra biológica del sujeto, independientemente de la presencia o ausencia del analito de unión de interés en la muestra biológica. Una vez unido al agente de captura presente sobre el lecho de control, inmoviliza el complejo e impide que continúe el flujo lateral con la muestra líquida. El agente de captura para el lecho de control puede aplicarse a la membrana porosa en cualquier conformación geométrica deseada. En el caso de que el desarrollo de una respuesta no sea positivo, el ensayo no es válido y debe repetirse usando un nuevo dispositivo de inmunocromatografía de la invención.

En el caso de que el analito de unión que está sometiéndose a análisis esté presente, o es susceptible a estar presente, en saliva, entonces también se prevé que el dispositivo de la invención comprenda además un recipiente para un dispositivo colector de saliva tal como un dispositivo de lecho de algodón. Preferiblemente, el dispositivo colector de saliva es el colector Omni-SAL® (Saliva Diagnostic Systems Inc., Brooklyn, Nueva York, EE.UU.).

El dispositivo de la invención también puede comprender lechos de impregnación, ubicados en el extremo distal de cada lecho de prueba. El lecho de impregnación puede estar sobre la misma membrana porosa que el lecho de prueba, o puede estar en una membrana porosa separada en contacto de flujo lateral con el lecho de prueba. El lecho de impregnación puede absorber y mantener la muestra biológica tras haber difundido por el ensayo, impidiendo que la muestra fluya en sentido opuesto, y haciendo que no se produzca unión no específica. El contacto con el lecho de prueba puede ser o bien mediante solapamiento o bien mediante conexión de extremo a extremo. Alternativamente, el lecho de impregnación puede estar sobre la misma membrana porosa que el lecho de prueba. El lecho de impregnación está compuesto por material poroso, habitualmente filtros de nitrocelulosa.

Habitualmente, el analito de unión debe poder migrar a través de flujo lateral con la muestra biológica. Si este no es el caso, el pretratamiento de la muestra biológica puede ayudar a fomentar la solubilización de la muestra biológica y la reducción de la unión no específica.

El lecho de muestra, el lecho de conjugado, el lecho de prueba y el lecho de impregnación pueden estar hechos de

diferente material, o pueden ser regiones separadas de la misma membrana porosa. El lecho de prueba puede contener los agentes de marcaje móviles, el agente de captura inmóvil y el agente de captura control inmóvil. En otras realizaciones, la región de detección de analito contiene sólo el reactivo de captura control inmovilizado y el reactivo de captura.

5 Adicionalmente, el sitio de aplicación de muestra del dispositivo de inmunocromatografía de la invención puede comprender medios para mantener en contacto el al menos un lecho de muestra con la muestra biológica de un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, el término “medios” se refiere a cualquier alternativa que permita, mantenga o favorezca contacto entre el lecho de muestra y la muestra biológica. Ejemplos no limitativos de medios son puentes y paredes.

10 En una realización adicional, un primer lecho de conjugado del dispositivo de inmunocromatografía de la invención se impregna con un anticuerpo anti-IgA humana marcado y un segundo lecho de conjugado se impregna con un anticuerpo anti-IgG humana marcado. En tal caso, dicho primer lecho de conjugado impregnado con un anticuerpo anti-IgA humana marcado está en comunicación con un primer lecho de prueba, estando recubierto dicho primer lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con anticuerpo anti-IgA humana o una parte de unión del mismo, y dicho segundo lecho de conjugado impregnado con un anticuerpo anti-IgG humana marcado está en comunicación con un segundo lecho de prueba, estando recubierto dicho segundo lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con un anticuerpo anti-IgG humana, una proteína ubicua o partes de unión de los mismos.

15 Habitualmente, se usará un material semirrígido para soportar el/los material(es) poroso(s) del dispositivo de inmunocromatografía de la invención. Este material semirrígido puede ser un trozo continuo de material laminado o trozos separados. El material laminado es preferiblemente vinilo, pero un experto en la técnica reconocerá que pueden usarse numerosos materiales para proporcionar el soporte semirrígido. Se requiere un grosor mínimo con el fin de producir la resistencia mecánica o soporte adecuado deseado para que el dispositivo de inmunocromatografía funcione eficazmente tal como proporcionar resistencia y soporte suficientes para el material poroso y el dispositivo de ensayo de manera que no resulte interferencia con el flujo lateral, por ejemplo por el colapso o la disgregación del dispositivo de inmunocromatografía tras humedecerse.

20 Cualquier material de plástico puede cubrir el material poroso del dispositivo. Preferiblemente, este plástico es Mylar, sin embargo, los expertos en la técnica conocerán diversos materiales que pueden usarse para tales fines. La cubierta puede ser un trozo de plástico continuo o trozos separados tal como se muestra en las figuras 1 y 3. Debe permitir que se observen las zonas de ensayo. Por tanto, si la cubierta es transparente entonces el resultado puede observarse a través de la cubierta transparente. Si la cubierta no es transparente, entonces debe usarse una ventana, un hueco o un orificio de modo que puedan observarse los resultados. Además, la cubierta puede dejar una parte del recipiente de muestra expuesto de modo que la muestra puede aplicarse a la región de recepción en una región denominada el sitio de aplicación de muestra (por ejemplo, referencias (1), figura 1A y (18), figura 3).

25 Alternativamente, el soporte y la cubierta de plástico pueden ser una carcasa de plástico moldeado. Preferiblemente, este plástico es un poliéster, sin embargo, los expertos en la técnica conocerán diversos materiales que pueden usarse para tales fines.

30 Se engloba en la presente invención el uso del dispositivo de inmunocromatografía descrito en el presente documento para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto.

35 También se engloba en la presente invención un método para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto para detectar simultáneamente la presencia de IgA total y anticuerpos contra TGasa2 en poblaciones con enfermedad celíaca en riesgo entre las que se encuentran las que tienen deficiencia de IgA, que comprende las etapas de

- 40 a) proporcionar el dispositivo de inmunocromatografía de la invención,
- 45 b) recoger la muestra biológica,
- 50 c) pretratar dicha muestra biológica en un tampón de pretratamiento,
- 55 d) poner en contacto la muestra biológica pretratada de la etapa c) con el lecho de muestra de dicho dispositivo de inmunocromatografía, permitiendo ese modo que dicha muestra biológica pretratada difunda lateralmente a al menos tres zonas de ensayo,
- 60 e) ejecutar un ensayo de flujo lateral permitiendo de ese modo que la muestra fluya a través del lecho de muestra hacia los lechos de conjugado y luego hacia los lechos de prueba, en el que dicho analito de unión, que es una inmunoglobulina seleccionada del grupo que comprende una IgA, una sIgA e IgG, o una combinación de las mismas, si está presente en dicha muestra biológica, entra en contacto en primer lugar con anticuerpo o bien anti-IgA

humana o bien anti-IgG humana de modo que se forman complejos con dicho anticuerpo anti-IgA humana o anti-IgG humana y en el que dichos complejos entran en contacto además con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma,

5 f) permitir el desarrollo de una respuesta y detectar la presencia del marcador presente sobre los complejos,

g) interpretar la respuesta para indicar la presencia de dicho analito de unión en dicha muestra biológica.

10 No hay ninguna limitación particular sobre los métodos para recoger una muestra biológica de un sujeto. Por ejemplo, se recoge una gota de sangre completa de la punta de un dedo usando un dispositivo de lanceta y se diluye en el tampón de pretratamiento descrito más adelante para una aplicación de prueba directa, o se almacena en tubos capilares recubiertos con heparina antes de las pruebas. Específicamente, se recoge saliva usando dispositivos de lecho de algodón tales como Omni SAL® (Saliva Diagnostic Systems Inc., Brooklyn, Nueva York, EE.UU.) [patente estadounidense n.º 5.260.031], dispositivo de muestra de líquidos orales para VIH-1 OraSure® y UpLink® (OraSure Technologies Inc., Betlehem, EE.UU.), Salivette® (Sarstedt, Newton, N.C., EE.UU.), mechas TRANSORB® (Filtrona Richmond Inc., Colonial Heights, Vancouver, EE.UU.). El lecho se coloca entonces en el tampón de pretratamiento tal como se describe en los ejemplos.

20 Preferiblemente, el método de la invención está diseñado para el diagnóstico de enfermedad celíaca, en particular en poblaciones con IgAD.

Las muestras biológicas tales como sangre completa, suero o saliva se diluyen en tampón de pretratamiento tal como se describe en los ejemplos. Puede añadirse un agente conservante al tampón de pretratamiento.

25 En el caso de que la muestra biológica sea saliva, la disolución de pretratamiento también permite procesar muestras de saliva para potenciar la detección de, por ejemplo, IgA contra TGasa2. Las interacciones de mucinas e IgA favorecen una tinción no específica y resultados falsos positivos. Tal como se conoce en la técnica, pueden añadirse mucolíticos o agentes reductores a la disolución de pretratamiento para escindir los enlaces químicos entre mucinas e IgA [24].

30 El método de la invención comprende además la etapa de poner en contacto la muestra biológica pretratada con el lecho de muestra del dispositivo de inmunocromatografía de la invención, permitiendo de ese modo que dicha muestra biológica pretratada difunda lateralmente a al menos tres zonas de ensayo.

35 Normalmente, la muestra biológica pretratada fluye a través del lecho de muestra hacia los lechos de conjugado y luego hacia los lechos de prueba que comprenden las zonas de ensayo. Cuando el analito de unión está presente en dicha muestra biológica, entra en contacto en primer lugar con agentes marcados impregnados en cada lecho de conjugado de modo que se forman complejos con dichos agentes marcados impregnados sobre los lechos de conjugado.

40 Tal como se describió anteriormente, el analito de unión es una inmunoglobulina y se selecciona del grupo que comprende una IgA, o una IgG o una combinación de las mismas. Preferiblemente, cuando el dispositivo de inmunocromatografía se usa para el diagnóstico de una enfermedad celíaca, el analito de unión es una IgA y/o una IgG.

45 También habitualmente, el agente marcado, diseñado para reconocer, unirse a y formar un complejo con el analito de unión, se selecciona del grupo que comprende un anticuerpo anti-IgA humana, anti-IgG humana. En el caso de que el analito de unión sea IgA y/o una IgG, entonces el agente marcado es un anticuerpo anti-IgA humana o un anticuerpo anti-IgG humana producido, por ejemplo, en cabra.

50 Preferiblemente, el marcador que está asociado con el agente se selecciona del grupo que comprende, pero sin limitarse a, enzimas, colorantes y partículas visibles.

55 Una vez formados los complejos, entran en contacto adicionalmente con agentes de captura o partes antigénicas de los mismos que se recubren, en la zona de ensayo, sobre lechos de prueba. El agente de captura puede "capturar" los complejos cuando están presentes en la muestra biológica. Habitualmente, el agente de captura es cualquier partícula o molécula tal como una proteína que reconoce o se une al complejo con el agente de marcaje que se ha unido al analito biológico en la muestra. El agente de captura se inmoviliza en el material poroso de los lechos de prueba, más particularmente ubicado en la zona de ensayo. El agente de captura no se ve afectado por el flujo lateral de la muestra líquida debido a la inmovilización en el material poroso. El agente de captura puede ser natural, o no natural, es decir, sintético. Una vez que el agente de captura se une al complejo de analito-agente marcado, impide que el complejo continúe con el flujo lateral de la muestra líquida.

65 El método de la invención comprende además las etapas de permitir el desarrollo de una respuesta y detectar la presencia del marcador presente en los complejos. Generalmente, la reacción se visualiza a través de la deposición de un complejo coloreado.

En el caso de que el marcador sea una enzima, entonces la adición de, por ejemplo, un sustrato coloreado específico para la enzima permitirá la visualización del complejo.

5 Habitualmente, el método de la invención comprende la etapa de interpretar la respuesta para indicar la presencia de dicho analito de unión en dicha muestra biológica. Generalmente, un examen visual de la zona de ensayo tras 10-20 minutos es suficiente para interpretar los resultados de la prueba. En referencia en más detalle a la realización preferida (ejemplo 2, figura 2), el dispositivo de inmunocromatografía debe colocarse con la ventana correspondiente a la zona de ensayo (14), que corresponde al control interno, delante del usuario. La prueba se valida si aparece una línea azul en esta ventana. Puede visualizarse un total de 5 combinaciones que conducen a 4 diagnósticos clínicos distintos tal como se describe en la figura 2 y la tabla 1.

Tabla 1

Zonas de ensayo				Interpretación
(14)	(15)	(16)	(17)	
+	+	-	-	El control interno muestra que la prueba se valida, el sujeto ni es deficiente en IgA ni padece EC.
+	+	+	-	El control interno muestra que la prueba se valida, el sujeto no es deficiente en IgA pero padece EC.
+	+	+	+	
+	-	-	-	El control interno muestra que la prueba se valida, el sujeto es deficiente en IgA pero no padece EC.
+	-	-	+	El control interno muestra que la prueba se valida, el sujeto es deficiente en IgA pero padece EC.

15 Preferiblemente, el tampón de pretratamiento se selecciona del grupo que comprende N-acetil-cisteína en tampón PBS o carbocisteína min en tampón PBS, opcionalmente con un agente reductor tal como DDT o SDS. También opcionalmente, puede añadirse un agente conservante tal como EDTA o azida sódica al tampón de pretratamiento. Encontrar el mejor tampón de pretratamiento según la muestra biológica está dentro de la capacidad del experto en la técnica.

Habitualmente, el marcador se selecciona del grupo que comprende cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, partículas metálicas y no metálicas coloidales, partículas de colorante, enzimas o sustratos, polímeros orgánicos, partículas de látex, liposomas con sustancias que producen señales y similares.

25 El método de una etapa está dedicado a la detección de IgA total simultáneamente con la detección de anticuerpos contra TGasa2 (con una sensibilidad de anticuerpos de clase IgA contra TGasa2 y con una sensibilidad de anticuerpos de clase IgG contra TGasa2) en la muestra biológica.

30 Además, dentro del alcance de la presente invención se encuentra un kit para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo dicho kit el dispositivo de inmunocromatografía tal como se describe en el presente documento, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

35 El kit de la presente invención puede comprender además un dispositivo colector de saliva.

Alternativa o adicionalmente, el kit puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas, por ejemplo para recoger la muestra biológica.

40 El kit puede incluir también un sistema que permite la detección de la respuesta. La respuesta puede detectarse visual o instrumentalmente dependiendo del marcador presente en los complejos. Las posibles respuestas pueden incluir la producción de productos coloreados, fluorescentes o luminiscentes, la alteración de las características de absorción o emisión de radiación por un producto o componente de ensayo, y precipitación o aglutinación de un producto de componente. Dicho componente puede ser un marcador, por ejemplo un radioisótopo, un fluoróforo, una enzima, una coenzima, un sustrato enzimático, un compuesto electrodenso o una partícula que puede aglutinarse.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son a modo de ejemplo de métodos de puesta en práctica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

50 **Ejemplos**

Ejemplo 1:

55 *Recogida de muestras*

Preferiblemente, las muestras son, por ejemplo, sangre completa, suero o saliva. Tampoco hay ninguna limitación particular sobre los métodos para recoger estas muestras. Por ejemplo, se recoge una gota de sangre completa de la punta de un dedo usando un dispositivo de lanceta y se diluye en el tampón de pretratamiento descrito a continuación para una aplicación de prueba directa, o se almacena en tubos capilares recubiertos con heparina antes de las pruebas. Específicamente, se recoge saliva usando dispositivos de lecho de algodón tales como Omni SAL® (Saliva Diagnostic Systems Inc., Brooklyn, Nueva York, EE.UU.) [patente estadounidense n.º 5.260.031], dispositivo de muestra de líquidos orales para VIH-1 OraSure® y UpLink® (OraSure Technologies Inc., Bethlehem, EE.UU.), Salivette® (Sarstedt, Newton, N.C., EE.UU.), mechas TRANSORB® (Filtrona Richmond Inc., Colonial Heights, Vancouver, EE.UU.). Por ejemplo, el lecho colector Omni-SAL® se coloca bajo la lengua hasta que un indicador se vuelva de color azul, señalando que se ha recogido 1 ml de saliva. El lecho se coloca en el tampón de pretratamiento descrito a continuación y puede o bien almacenarse a 4°C antes de las pruebas o bien se extrae usando un filtro adaptado para una aplicación de prueba inmediata.

15 *Procesamiento de muestras*

La muestras biológicas (sangre completa, suero o saliva) se diluyen en 1 ml de tampón de pretratamiento con la siguiente composición: solución salina tamponada con Tris (TBS) a un pH de 7,3 que contiene un detergente no iónico tal como Tween® 20 o Triton X-100® a una concentración del 0,3%. Puede usarse un agente conservante tal como azida sódica o ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA). La disolución de pretratamiento también permite procesar muestras de saliva para potenciar la detección de IgA contra TGasa2. Las interacciones de mucinas e IgA favorecen la unión no específica y resultados falsos positivos. Tal como se conoce en la técnica, pueden añadirse mucolíticos tales como N-acetil-cisteína o carbocisteína a la disolución de pretratamiento para escindir los enlaces químicos entre mucinas e IgA [24]. La adición de agentes reductores tales como ditioneitol (DTT) o dodecilsulfato de sodio (SDS) a bajas concentraciones (entre 0,5 y 2,5 mM) tiene el mismo efecto al romper los puentes disulfuro al tiempo que conserva la capacidad de unión a antígeno de las inmunoglobulinas requerida para un inmunoensayo [25, 26].

30 Ejemplo 2:

Se ilustrarán dos formas preferidas de realizaciones de la invención como ejemplos en los dibujos y se describirán en detalle en el presente documento, aunque son posibles diferentes realizaciones. Además, ambas formas de realizaciones están diseñadas para adaptarse a los colectores de saliva existentes. La atención específica sobre muestras de saliva se debe a la característica no invasiva de la recogida de saliva que es la más adecuada para fines de examen, especialmente dentro de la población pediátrica.

En la figura 1A, el dispositivo de prueba tiene una configuración circular y tal como se define permite un análisis dirigido simultáneo. El sitio (1) de aplicación de la muestra está diseñado para adaptarse a dispositivos colectores de saliva tales como Omni-SAL®. La parte de extremo del filtro (2) se inserta en el recipiente (3) de muestra. Empujar el colector (4) hacia el dispositivo (5) de prueba permite filtrar la muestra que fluye sobre el lecho (6) de muestra colocado en el centro del dispositivo de prueba, tal como se muestra en la figura 1B.

Otras muestras pueden cargarse directamente sobre el lecho de muestra usando pipetas o dispositivos similares. Se especifica que el lecho de muestra permite un volumen de capa grande ($> 25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) y también se usa para cargar bajas concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) y tensioactivos tales como Tween® 20 para fomentar la resolubilización de los anticuerpos secundarios marcados y reducir la unión no específica. La muestra se distribuye entonces uniformemente por los lechos de conjugado (7, figura 1B) fomentando la reconstitución de anticuerpos secundarios marcados. También se especifica que el lecho de conjugado mantiene un volumen de capa alto. Tanto para el lecho de muestra como para el de conjugado, pueden usarse diferentes materiales con propiedades absorbentes tales como celulosa, fibra de vidrio, fibra de vidrio unida y malla tejida, pero preferentemente filtros de celulosa. Todos estos materiales permiten que la muestra depositada en un extremo del ensayo o tira de prueba migre y difunda lateralmente al extremo opuesto mediante acción capilar. Se inmovilizan dos anticuerpos monoclonales marcados anti-ser humano diferentes, anti-IgA y anti-IgG sobre los diferentes lechos de conjugado. El analito de unión, si está presente en la muestra biológica, entra en contacto en primer lugar con agentes marcados tales como los anticuerpos secundarios marcados impregnados en cada lecho de conjugado de modo que se forman complejos con anticuerpos secundarios marcados que han migrado y dichos complejos migran además lateralmente a los lechos (8) de prueba (tal como se demuestra mediante las flechas, figura 1B) donde se inmoviliza el agente de captura específico o una parte antigénica del mismo. Pueden usarse diferentes polímeros de membrana para constituir los lechos de prueba tales como nitrocelulosa, poli(fluoruro de vinilideno), nailon modificado con carga o polietersulfona, pero preferentemente membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de $0,4 \mu\text{m}$. Como ejemplo, las membranas High-Flow Plus® (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) con un tiempo de flujo capilar que oscila entre 120 y 180 s/4 cm cumplen los requisitos de la prueba diseñada.

Están ubicados lechos (9) de impregnación compuestos por filtros de nitrocelulosa en los extremos distales de cada lecho de prueba para contener el fluido en exceso.

La figura 1B detalla el conjunto de tira de prueba dentro de la realización de configuración circular. El lecho (6) de muestra tiene una conformación en cruz y se solapa con los lechos (7) de conjugado dentro de los 4 carriles (10), (11), (12) y (13). En el carril (10) y (11), se inmoviliza anticuerpo anti-IgA humana marcado en el lecho de conjugado. Se inmoviliza anticuerpo anti-IgG humana marcado en el lecho de conjugado del carril (12). El carril (13) contiene los elementos necesarios para el control de las condiciones inmunocromatográficas. Cada carril corresponde a un *marcador diana* específico que va a revelarse sobre la membrana de nitrocelulosa tal como:

- carril 10, el anticuerpo anti-IgA humana revela la IgA total en la muestra biológica;
- carril 11, TGasa2 revela la presencia de IgA contra TGasa2 en la muestra biológica;
- carril 12, TGasa2 revela la presencia de IgG contra TGasa2 en la muestra biológica;
- carril 13 valida la prueba.

La figura 2 muestra las diversas interpretaciones de la prueba según los resultados visuales. Para leer los resultados, el dispositivo de prueba se coloca con la ventana triangular (zona (14) de ensayo) delante del usuario. Esta ventana corresponde al control interno. Es necesario visualizar una línea de color azul dentro de esta ventana para que la prueba se valide. Si no aparece la línea, la prueba falló y es necesario repetirla, si es necesario, con otro dispositivo de inmunocromatografía. Las otras ventanas dan los siguientes resultados:

- zona (15) de ensayo: IgA total
- zona (16) de ensayo: IgA contra TGasa2
- zona (17) de ensayo: IgG contra TGasa2

Puede visualizarse un total de 5 combinaciones que conducen a 4 diagnósticos clínicos distintos tal como se describe en la figura 2.

La figura 3A muestra otra forma de realización para la invención. El recipiente (18) de muestra también está diseñado para adaptarse a un colector de saliva tal como Omni-SAL®, pero otros tipos de muestras pueden cargarse directamente sobre el lecho de muestra usando pipetas o dispositivos similares. Tal como se detalla en la figura 3B, el lecho (19) de muestra tiene una conformación de herradura. La muestra biológica migra lateralmente a lo largo de ambos canales (20), (21), y avanza a través de los lechos de conjugado que contienen anticuerpo (22) anti-IgA humana marcado en un lado y anticuerpo (23) anti-IgG humana marcado en el otro lado. Sobre una primera membrana (24), se inmovilizan dos agentes marcados, anticuerpo anti-IgA humana para la detección de IgA total y TGasa2 para revelar la presencia de IgA contra TGasa2. Para lograr una sensibilidad superior, se coloca TGasa2 aguas abajo de anticuerpo anti-IgA humana. Sobre una segunda membrana (25), se depositan TGasa2 así como aguas abajo todos los elementos necesarios para el control interno de las condiciones inmunocromatográficas. Se colocan lechos (26), (27) de impregnación en ambos extremos de las tiras de ensayo o prueba. Los resultados se visualizan del mismo modo que se describió anteriormente conduciendo a 5 posibles combinaciones y 4 diagnósticos clínicos distintos.

Ambos dispositivos de prueba ilustrados y descritos anteriormente cumplen los requisitos necesarios para una herramienta de examen universal que permite la detección de EC en todos los grupos en riesgo sin necesidad de realizar pruebas adicionales. El dispositivo de prueba descrito en el presente documento es significativamente menos caro que los ensayos de ELISA de laboratorio reales. Puede usarse sobre diferentes muestras biológicas, pero preferentemente sobre saliva debido a los métodos de recogida no invasivos. Como tal, el dispositivo se adapta a los colectores de saliva existentes. El análisis es un procedimiento de una etapa sencillo que produce resultados rápidos.

Ejemplo 3:

Recogida de muestras

No hay ninguna limitación particular en cuanto a los tipos de muestras biológicas que van a someterse a prueba. Preferiblemente, las muestras son, por ejemplo, sangre completa, suero o saliva. Tampoco hay ninguna limitación particular sobre los métodos para recoger estas muestras. Por ejemplo, puede recogerse una gota de sangre completa de la punta de un dedo usando un dispositivo de lanceta y diluirse en el tampón de pretratamiento descrito a continuación para una aplicación de prueba directa, o almacenarse en tubos capilares recubiertos con heparina antes de las pruebas. Específicamente, puede recogerse saliva usando dispositivos de lecho de algodón tales como Omni SAL® (Saliva Diagnostic Systems Inc., Brooklyn, Nueva York, EE.UU.) [patente estadounidense n.º 5.260.031], dispositivo de muestra de líquidos orales para VIH-1 OraSure® y UpLink® (OraSure Technologies Inc., Bethlehem, EE.UU.), Salivette® (Sarstedt, Newton, N.C., EE.UU.), mechas TRANSORB® (Filtrona Richmond Inc., Colonial Heights, Vancouver, EE.UU.). Como ejemplo, se coloca el lecho colector Omni-SAL® bajo la lengua hasta

que un indicador se vuelve de color azul señalando que se ha recogido 1 ml de saliva. El lecho se coloca en el tampón de pretratamiento descrito a continuación y puede o bien almacenarse a 4°C antes de las pruebas o bien se extrae usando un filtro adaptado para una aplicación de prueba inmediata.

5 *Procesamiento de muestras*

La disolución de pretratamiento de muestra está adaptada para adecuarse a todos los tipos de muestras biológicas, pero se aplica preferentemente a sangre completa, suero y saliva.

10 La muestras biológicas (sangre completa, suero o saliva) se diluyen en 1 ml de tampón de pretratamiento con la siguiente composición: solución salina tamponada con Tris (TBS) a un pH de 7,3 que contiene un detergente no iónico tal como Tween® 20 o Triton X-100® a una concentración del 0,3%. Puede usarse un agente conservante tal como azida sódica o ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA).

15 Ejemplo 4:

Aunque los siguientes ensayos de ejemplo se han realizado mediante ELISA, confirman completamente los resultados obtenidos con el dispositivo de la invención.

20 *Sujetos*

El objetivo de este estudio clínico era validar el uso de la combinación de marcadores tanto en saliva como en suero. En primer lugar se sometieron a prueba las muestras en una plataforma de ELISA antes de someterlas a prueba adicionalmente en pruebas de flujo lateral. El estudio clínico estaba diseñado para recoger muestras de saliva de
25 pacientes en consulta en la División de Gastroenterología del Departamento Pediátrico del Hospital Universitario de Lausanne (CHUV) en Suiza. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos en estudio. El estudio fue aprobado por el comité de revisión institucional aplicable. Se incluyó un total de 30 pacientes en el estudio. Se clasificaron los sujetos en 6 grupos. El grupo I comprendía 4 pacientes no tratados con EC (2 chicos y 2 chicas; mediana de edad de 11 años; intervalo de 7-15 años) diagnosticados en 2007 según los criterios de ESPGHAN. Dos
30 de los pacientes tenían una presentación de EC atípica con insuficiencias de crecimiento aisladas. Otro tenía una forma de EC silenciosa en el contexto de una diabetes de tipo I. El último padecía EC con una presentación clásica.

El grupo II estaba compuesto por 6 pacientes diagnosticados con EC (6 chicas; mediana de edad de 23 años; intervalo de 18-34 años) con una dieta libre de gluten mal controlada.

35 El grupo III comprendía 5 pacientes diagnosticados con EC (4 chicas y 1 chico; mediana de edad de 18 años; intervalo de 6-18 años) con una dieta libre de gluten estricta durante al menos 6 meses.

40 El grupo IV estaba compuesto por 3 pacientes con IgAD entre los cuales había 2 pacientes con EC (1 chica y 2 chicos; mediana de edad de 9 años; intervalo de 9 años).

El grupo V comprendía 6 controles sanos (2 chicas y 4 chicos; mediana de edad de años; intervalo de años). Ninguno de ellos padecía otra enfermedad autoinmunitaria.

45 *Muestras de suero*

Se recogió sangre mediante punción venosa y se extrajo el suero mediante centrifugación. Se diluyeron las muestras de suero 1:101 tal como describen las instrucciones del fabricante (IgA e IgG QUANTA Lite™ h-tTG de Inova Diagnostics Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

50 *Método de recogida de saliva*

Se recogieron muestras de saliva en todos los pacientes usando el dispositivo colector OmniSAL™ (StatSure Inc., Framingham, MA, EE.UU.). Este dispositivo consistía en un lecho de celulosa unido a un vástago de plástico que contenía un colorante indicador. Se colocó el lecho bajo la lengua del paciente. El colorante se volvió azul cuando se
55 había recogido 1 ml de saliva. Entonces se retiró el lecho del vástago girando manualmente en un tubo de transporte que contenía un tampón fosfato modificado con azida sódica y Tween 20 (0,2%) a pH fisiológico (StatSure Inc., Framingham, MA, EE.UU.). Se almacenaron las muestras inmediatamente a -804°C y se descongelaron sólo una vez antes de las pruebas.

60 *Extracción y procesamiento de saliva*

Antes del procesamiento y las pruebas, se extrajo saliva del lecho colector usando filtro de estilo pistón que se insertó manualmente en el tubo de transporte. Se obtuvo en el filtro aproximadamente 1 ml de una disolución transparente que consistía en volúmenes aproximadamente iguales de saliva y tampón. Se prepararon disoluciones acuosas desmineralizadas estériles que contenían diferentes concentraciones de N-acetil-cisteína (Sigma Aldrich

Grade A7250) 10 g/l, 20 g/l y 50 g/l. Se añadieron 5 μ l de cada una de estas disoluciones a 100 μ l de muestra extraída variando las concentraciones finales de N-acetil-cisteína (NAC) desde 0,2 hasta 2,4 g/l de saliva. Entonces se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se usaron muestras de saliva o bien puras o bien diluidas 1:10 antes de las pruebas.

5

Detección de anticuerpos anti-TGasa2 e IgA total

Se realizaron ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-TGasa2 IgG e IgA. Se usó un kit comercial, IgA e IgG QUANTA Lite™ h-tTG de Inova Diagnostics Inc. (San Diego, CA, EE.UU.). Se realizaron estas pruebas tanto sobre muestras de suero como de saliva para todos los pacientes, según las instrucciones de uso del fabricante. Se midió la IgA total en suero usando tecnología de ELISA.

10

Resultados

La concentración de anticuerpos en suero es 10 veces superior (IgA en el intervalo de 75 a 300 μ g/ml) que en saliva (IgA en el intervalo de 30 ± 15 μ g/ml). Sin embargo, un factor de dilución 1:10 tenía un impacto demasiado fuerte sobre la sensibilidad de la prueba produciendo medidas de absorbancia muy bajas. Todos los ensayos adicionales se realizaron usando saliva pura.

15

La saliva es un medio heterogéneo con propiedades de viscosidad debido a la presencia de mucinas. Estas últimas están entre las proteínas glicosiladas más grandes (de 2 a 50 MDa) que se secretan sobre la superficies mucosas para proteger las células [4]. Tienen la particularidad de formar agregados y complejos con otros polímeros, y por tanto inducen una fuerte tinción de fondo no específica en inmunoensayos [5]. Además, los anticuerpos quedan atrapados dentro de estos filamentos de mucina induciendo una pérdida de señal para el inmunoensayo. La necesidad de un pretratamiento mucolítico y reductor (combinación de NAC y Tween 20) de las muestras de saliva tiene varias ventajas. Permite que la degradación de agregados de mucina haga que la muestra sea más fluida para la migración por flujo lateral. También induce la escisión de los enlaces químicos entre mucinas e inmunoglobulinas. Este efecto se ilustra en la figura 4A.

20

25

A una concentración de 0,4 g/l de NAC y Tween 20 al 0,2%, los controles negativos mostraron los valores de DO más bajos. En comparación, muestras de saliva de pacientes con EC tratadas usando las mismas concentraciones de tampón produjeron diferencias no significativas con valores de DO de muestras no tratadas. El efecto principal del tampón de pretratamiento era evitar la tinción de fondo no específica de las mucinas y por tanto aumentar la discriminación entre las poblaciones positivas y negativas.

30

35

Usando la concentración óptima de agentes mucolíticos y reductores que reducía la mayor parte de la señal para los controles negativos, se evaluaron los diferentes grupos de pacientes para detectar IgA e IgG anti-TGasa2. Los resultados se muestran en la figura 4B. Cuando se consideran todos los grupos de pacientes, es difícil discriminar las diferentes poblaciones. Hay solapamientos importantes entre el grupo I (EC no tratada), II (mal cumplimiento de la dieta) y III (buen cumplimiento de la dieta). Cuando se elimina el grupo II, se hace posible la discriminación entre las otras poblaciones, tal como se muestra en la figura 5. Estos resultados preliminares demuestran que es viable usar saliva para distinguir entre un paciente con EC no tratada y un individuo sano. Por tanto, la saliva podría ser un medio de examen no invasivo excelente. Sin embargo, cuando se considera el seguimiento de pacientes con EC a dieta, se hace muy difícil discriminar los cumplimientos bueno y malo de la dieta. Para esta aplicación particular, el uso de o bien sangre completa o bien suero parece más adecuado. Esto se resalta en la figura 5.

40

45

Se midieron los niveles de IgG anti-TGasa2 en muestras de saliva tratadas y no tratadas de pacientes de los 5 grupos. Con la excepción de un paciente con EC con IgAD del grupo IV, no se detectaron anticuerpos IgG anti-TGasa2. Estos resultados preliminares son prometedores y parecen confirmar la especificidad de IgG anti-TGasa2 en saliva para diagnosticar EC en pacientes con IgAD. Sin embargo, serán necesarias más muestras de pacientes para llegar a conclusiones positivas sobre el uso de saliva para diagnosticar estos pacientes.

50

Con respecto a inmunoglobulinas salivares para la enfermedad sistémica, siguen siendo un reto. En el caso de EC, se han considerado dos subclases de inmunoglobulinas, IgA e IgG, teniendo cada una un origen diferente en la saliva. La primera se sintetiza por plasmocitos en glándulas salivales, y se secreta en forma de dímeros (IgA secretora). La segunda se deriva de suero principalmente a través de hendiduras gingivales y de trasudado de mucosa oral [6]. Uno de los retos es optimizar el procedimiento de recogida de saliva con el fin de recoger tanto IgA como IgG. Recogiendo saliva de debajo de la lengua, se recogió IgA secretada de la glándula sublingual así como IgG del trasudado de mucosa oral. Esto se ha demostrado anteriormente en el contexto de pruebas de VIH orales [7]. Tiene la ventaja de capturar tanto sIgA que refleja la inmunidad del intestino con respecto al direccionamiento de células B activadas dentro de las glándulas salivales menores como IgG de suero.

55

60

Aunque la invención se ha ilustrado mediante referencia a realizaciones preferidas y específicas, los expertos en la técnica reconocerán que pueden realizarse variaciones y modificaciones a través de la experimentación y práctica de rutina de la invención. Por tanto, se pretende que la invención no se limite por la descripción anterior, sino que se defina por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

65

Bibliografía

- 5 [1] Freitag T., Schulze-Koops H., Niedobitek G., *et al.* The role of immune response against tissue transglutaminase in the pathogenesis of celiac disease. *Autoimmun. Rev.* 2004; 3: 13-20.
- [2] Esposito C. y Caputo I. Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and pathophysiological relevance. *FEBS.* 2005; 272: 615-31.
- 10 [3] Molberg O., Solheim Flaete N., Jensen T., *et al.* Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterol.* 2003; 125: 337-44.
- [4] Lo W., Sano K., Lebwohl B., *et al.* Changing presentation of adult celiac disease. *Dig. Dis. Sci.* 2003; 48: 395-8.
- 15 [5] Lewis H.M., Renaula T.L., Garioch J.J., *et al.* Protective effect of gluten-free diet against development of lymphoma in dermatitis herpetiformis. *Br. J. Dermatol.* 1996; 135: 363-7.
- [6] Tommasini A., Not T., Kiren V., *et al.* Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch. Dis. Child.* 2004; 89: 512-15.
- 20 [7] Mein S.M., Ladabaum U. Serological testing for celiac disease in patients with symptoms of irritable bowel syndrome: a cost-effective analysis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 19: 1199-1210.
- [8] American Gastroenterological Association medical position statement: celiac sprue. *Gastroenterol.* 2001; 120: 1522-25.
- 25 [9] Robins G. y Howdle P.D. Advances in celiac disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2005; 21: 152-61.
- [10] Fasano A. y Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterol.* 2001; 120: 636-51.
- 30 [11] Sandolfi L., Pratesi R. Cordoba J.C., *et al.* Prevalence of celiac disease in healthy blood donors in Brazil. *Am. J. Gastroenterol.* 2000; 95: 689-92.
- 35 [12] Green P.H., y Jabri B. Coeliac disease. *Lancet.* 2003; 362: 383-91.
- [13] Cataldo F., Marino V., Ventura A., *et al.* Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in celiac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) y "Club del tenue" Working Group on Coeliac Disease. *Gut.* 1998; 42: 362-5.
- 40 [14] Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin. Immunol.* 2001; 21: 303-9.
- [15] Collin P., Maki M., Keyrilainen O., *et al.* Selective IgA deficiency and celiac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1992; 27: 367-71.
- 45 [16] Revised criteria for diagnosis of celiac disease. Report of Working Group of European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch. Dis. Child.* 1990; 65: 909-11.
- [17] Dieterich W, Ehnis T, Bauer M *et al.*, Identification of Tissue Transglutaminase as the Autoantigen of Celiac Disease. *Nat Med* 197; 3: 797-801; documento WO 98/03872 Immunological Process for Detecting Antibodies Directed Towards Tissue Transglutaminase (TTG), Use of TTG for Diagnostic Purposes and Therapy Control, and Oral Pharmaceutical Agent Containing TTG, Schuppan D, Dieterich W.
- 50 [18] Salmaso C., Ocmant A., Pesce G., *et al.* Comparison of ELISA for tissue transglutaminase autoantibodies with antiendomysium antibodies in pediatric and adult patients with celiac disease. *Allergy.* 2001; 56(6): 544-7.
- 55 [19] Sorell L, Garrote JA, Acevedo B, *et al.*, One-step Immunochromatographic Assay for Screening of Coeliac Disease. *Lancet* 2002; 359: 945-946. Patente EP 1.164.375, Assay for Anti-transglutaminase Antibodies, Sorell LT, Aroya H, Acevedo BE, Cerro H.
- 60 [20] Solicitud de patente WO2004016065, Immunochromatography system and method for the simultaneous identification of AGA and T-TG antibodies and use thereof for the diagnosis of celiac disease, Mendez Corman E., Genzor Asin C.G., Gamen Sierra S., Corbaton Panplona V.M., Navarro Galindo A., Villacampa R.M.
- 65 [21] Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2005; 40: 1-19.

- [22] Korponay-Szabo I.R., Kovacs J.B., Czinner A., *et al.* High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1999; 28:26-30.
- 5 [23] Moher D. y Schachter H.M. Evidence report/technology assessment on celiac disease #104. Publicación AHRQ número 04-E029-2. 2004. www.ahrq.gov.
- [24] Solicitud de patente WO2005124344, Method for detecting anti-transglutaminase antibodies. Mascart F. y Ocmant C.
- 10 [25] Grebski E., Peterson C., y Medici T.C. Effect of physical and chemical methods of homogenization on inflammatory mediators in sputum of asthma patients. *Chest.* 2001; 119(5): 1521-5.
- [26] Angeretti A., Merlino C., Ferrara B., *et al.* Effect of mercaptans on serum IgA. *Boll. Ist. Sieroter. Milán.* 1986; 65(5): 380-5.
- 15 [27] Patente CA1323832, Process for immunochromatography with colloidal particles, Shing S. y Gordon J.
- [28] Single Step Heterogeneous Assay - (Immunochromatography); inventor: Litman David Jay; Zuk Robert Frank; (+1) solicitante: SYNTEX INC EC: G01N33/535; G01N33/543K4 IPC: G01N33/535; G01N33/543; G01N33/535 (+2); información de publicación: AU585505B - 1989-06-22.
- 20 [29] Stazi A.V. y Trinti B. Reproduction, endocrine disorders and celiac disease: risk factors of osteoporosis. *Minerva Med.* Abril de 2006; 97(2):191-203.
- 25 [30] Gass M. y Dawson-Hughes B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. *Am J Med.* Abril de 2006; 119 (4 supl. 1):S3-S11.
- [31] Bonnick S.L. y Shulman L. Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both? *Am J Med.* Abril de 2006; 119 (4 supl. 1):S25-31.
- 30 [32] North American Menopause Society (NAMS). Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause.* Mayo-junio de 2006; 13(3):340-67.
- [33] Koka S., Forde M.D., y Khosla S. Systemic assessments utilizing saliva: part 2 osteoporosis and use of saliva to measure bone turnover. *Int J Prosthodont.* Enero-febrero de 2006; 19(1):53-60.
- 35 [34] Jurjus Abdo R *et al.*; Diagnostics markers for Celiac disease in blood and body fluids. *FASEB Journal*, 1995, 19 (5, supl.. S, parte 2):pA 1068.
- 40 [35] Lahteenoja H *et al.*; Salivary antigliadin and antiendomysium antibodies in celiac disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1999, 50/5, p528-535.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de inmunocromatografía para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto para detectar simultáneamente la presencia de IgA total y anticuerpos contra TGasa2 en poblaciones con enfermedad celíaca en riesgo entre las que se encuentran las que tienen deficiencia de IgA, siendo dicho analito de unión una inmunoglobulina seleccionada del grupo que comprende una IgA, una sIgA e IgG, o una combinación de las mismas, que comprende un sitio de aplicación de muestra para recibir dicha muestra biológica, lechos de conjugado que permiten que dicho analito de unión presente en dicha muestra biológica se una a un agente marcado, y lechos de prueba que comprenden zonas de ensayo,
 - en el que
 - iii) se impregna un primer lecho de conjugado con un anticuerpo anti-IgA humana marcado y está en comunicación con un primer lecho de prueba, estando recubierto dicho primer lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con anticuerpo anti-IgA humana o una parte de unión del mismo, y
 - iv) se impregna un segundo lecho de conjugado con un anticuerpo anti-IgG humana marcado y está en comunicación con un segundo lecho de prueba, estando recubierto dicho segundo lecho de prueba, en la zona de ensayo, con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma y con anticuerpo anti-IgG humana, una proteína ubicua o partes de unión de los mismos,
 - y en el que el sitio de aplicación de muestra está adaptado para dirigir al menos parte de dicha muestra biológica de un sujeto a través de dichos lechos de conjugado a al menos tres zonas de ensayo de dichos lechos de prueba y al menos uno de dichos lechos de prueba comprende dos zonas de ensayo.
2. Dispositivo de inmunocromatografía según la reivindicación 1, en el que el sitio de aplicación de muestra comprende al menos un lecho de muestra.
3. Dispositivo de inmunocromatografía según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que un lecho de prueba es un lecho de control.
4. Dispositivo de inmunocromatografía según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la muestra biológica de un sujeto se selecciona del grupo que comprende sangre completa, suero, plasma, saliva, orina, tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo.
5. Dispositivo de inmunocromatografía según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho dispositivo de inmunocromatografía comprende además un recipiente para un dispositivo colector de saliva.
6. Dispositivo de inmunocromatografía según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el sitio de aplicación de muestra comprende medios para mantener en contacto el al menos un lecho de muestra con la muestra biológica de un sujeto.
7. Dispositivo de inmunocromatografía según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el sitio de aplicación de muestra está centrado o descentrado.
8. Dispositivo de inmunocromatografía según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además lechos de impregnación.
9. Método para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto para detectar simultáneamente la presencia de IgA total y anticuerpos contra TGasa2 en poblaciones con enfermedad celíaca en riesgo entre las que se encuentran las que tienen deficiencia de IgA, que comprende las etapas de
 - a) proporcionar el dispositivo de inmunocromatografía según cualquiera de las reivindicaciones 1-8,
 - b) pretratar dicha muestra biológica en un tampón de pretratamiento,
 - c) poner en contacto la muestra biológica pretratada de la etapa b) con el lecho de muestra de dicho dispositivo de inmunocromatografía, permitiendo de ese modo que dicha muestra biológica pretratada difunda lateralmente a al menos tres zonas de ensayo de dichos lechos de prueba,
 - d) ejecutar un ensayo de flujo lateral permitiendo de ese modo que la muestra fluya a través del lecho de muestra hacia los lechos de conjugado y luego hacia los lechos de prueba, en el que dicho analito de unión, que es una inmunoglobulina seleccionada del grupo que comprende una IgA, una sIgA, e IgG, o una

combinación de la mismas, si está presente en dicha muestra biológica, entra en contacto en primer lugar con anticuerpo o bien anti-IgA humana o bien anti-IgG humana de modo que se forman complejos con dicho anticuerpo anti-IgA humana o anti-IgG humana y en el que dichos complejos entran en contacto además con transglutaminasa tisular 2 (TGasa2) o una parte antigénica de la misma,

- 5
- e) permitir el desarrollo de una respuesta y detectar la presencia del marcador presente en los complejos,
- f) interpretar la respuesta para indicar la presencia de dicho analito de unión en dicha muestra biológica.
- 10 10. Método según la reivindicación 9, en el que el tampón de pretratamiento se selecciona del grupo que comprende N-acetil-cisteína en tampón PBS o carbocisteína en tampón PBS.
- 15 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que el marcador se selecciona del grupo que comprende cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, partículas metálicas y no metálicas coloidales, partículas de colorante, enzimas o sustratos, polímeros orgánicos, partículas de látex, y liposomas con sustancias que producen señales.
- 20 12. Kit para determinar la presencia de un analito de unión en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo dicho kit el dispositivo de inmunocromatografía según las reivindicaciones 1-8, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.
13. Kit según la reivindicación 12, que comprende además un dispositivo colector de saliva.

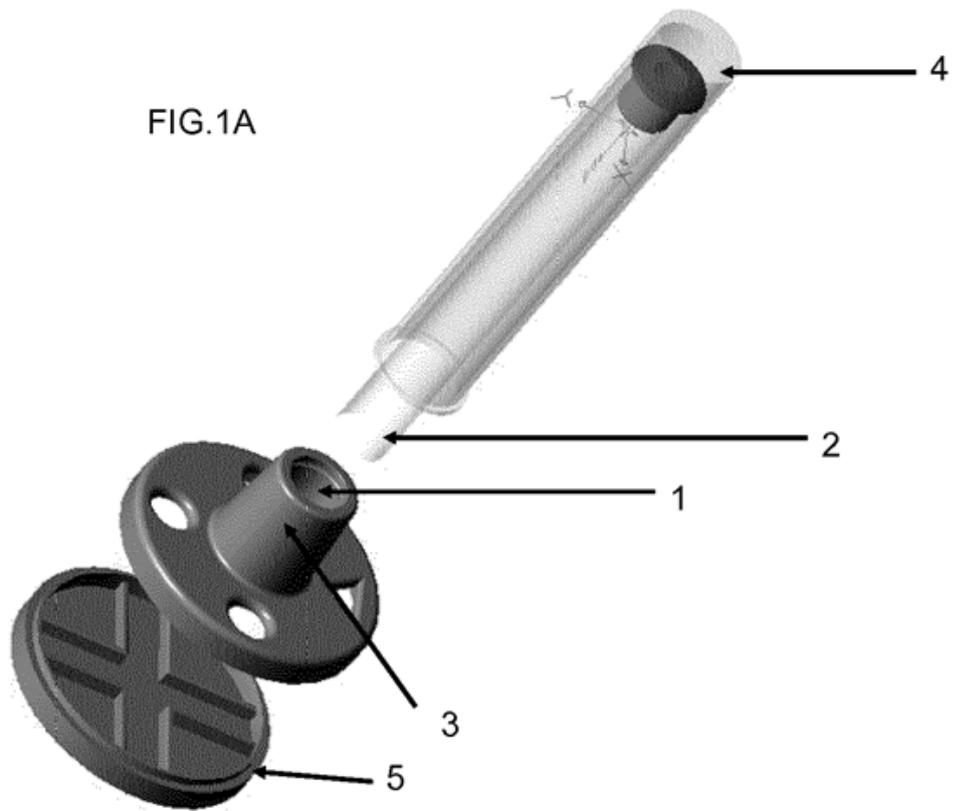
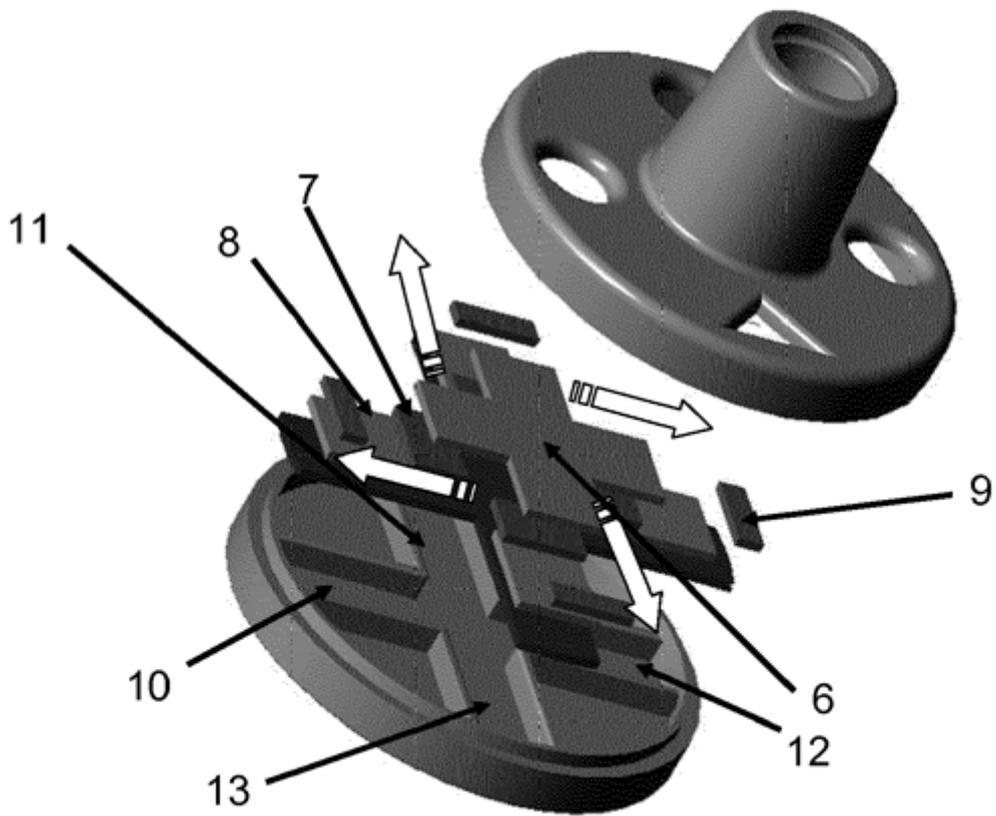
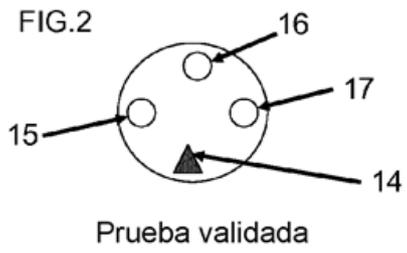
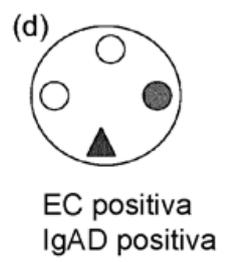
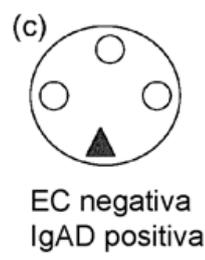
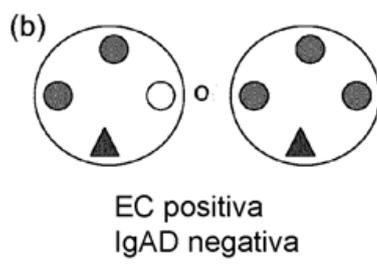
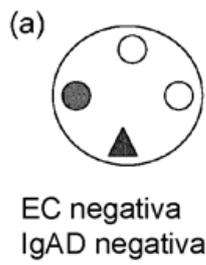


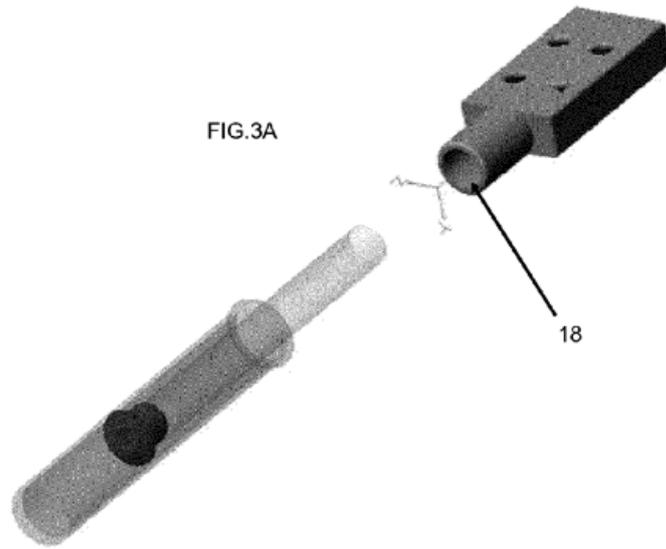
FIG.1B





14 control interno
15: IgA total
16: IgA contra TGasa2
17: IgG contra TGasa2





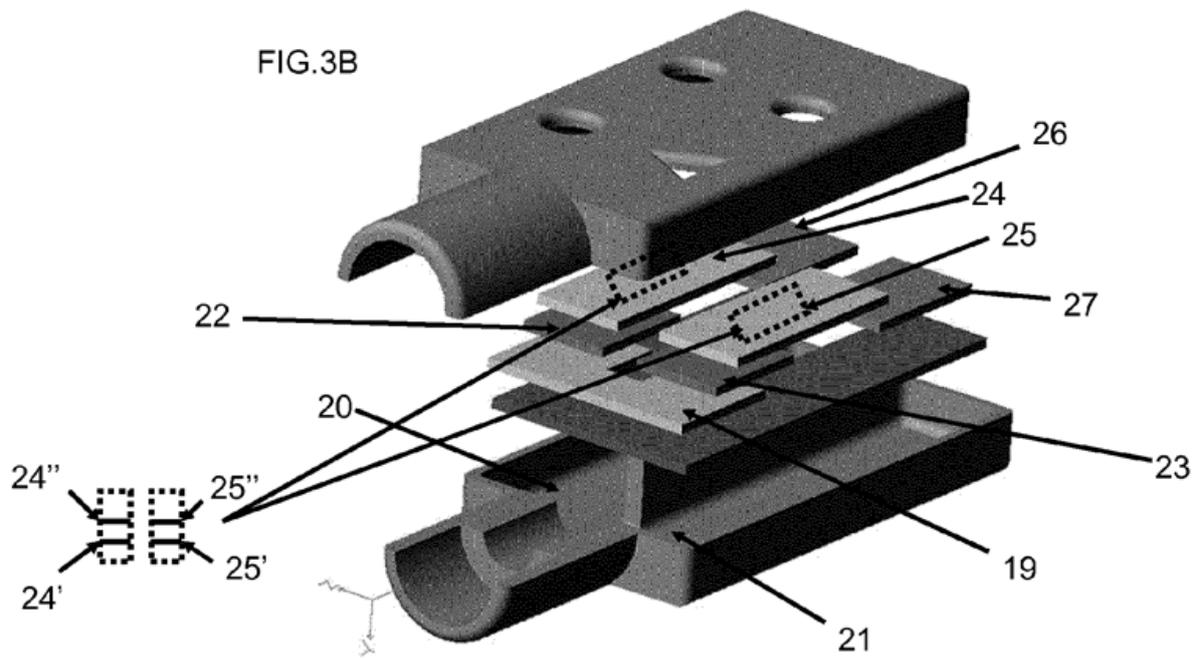


FIG. 4 A

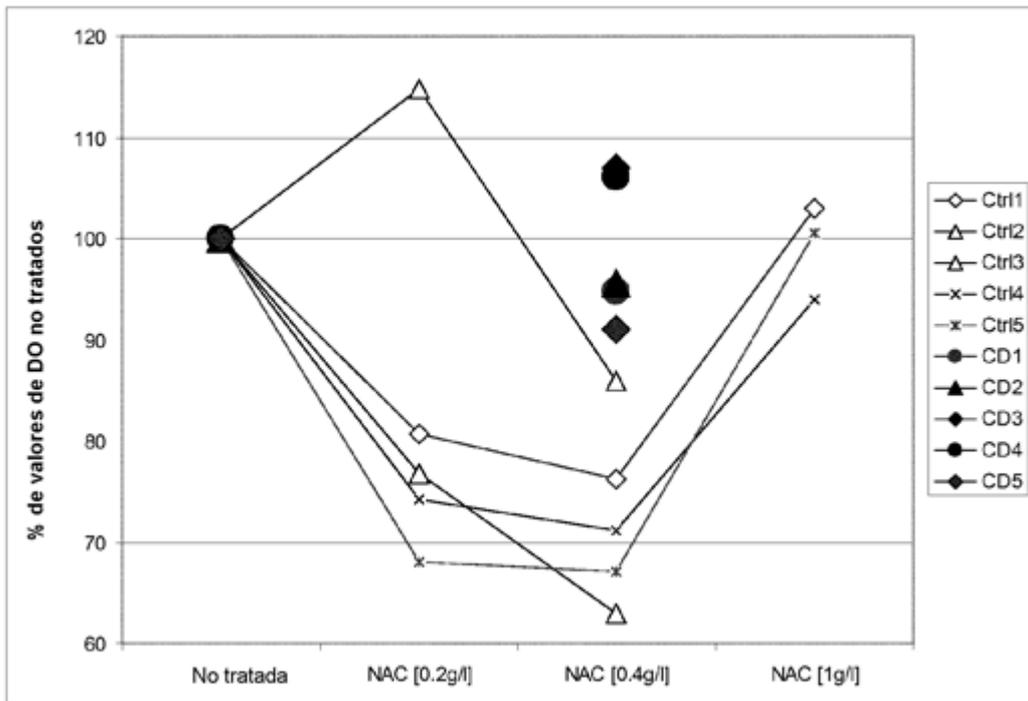


FIG. 4 B

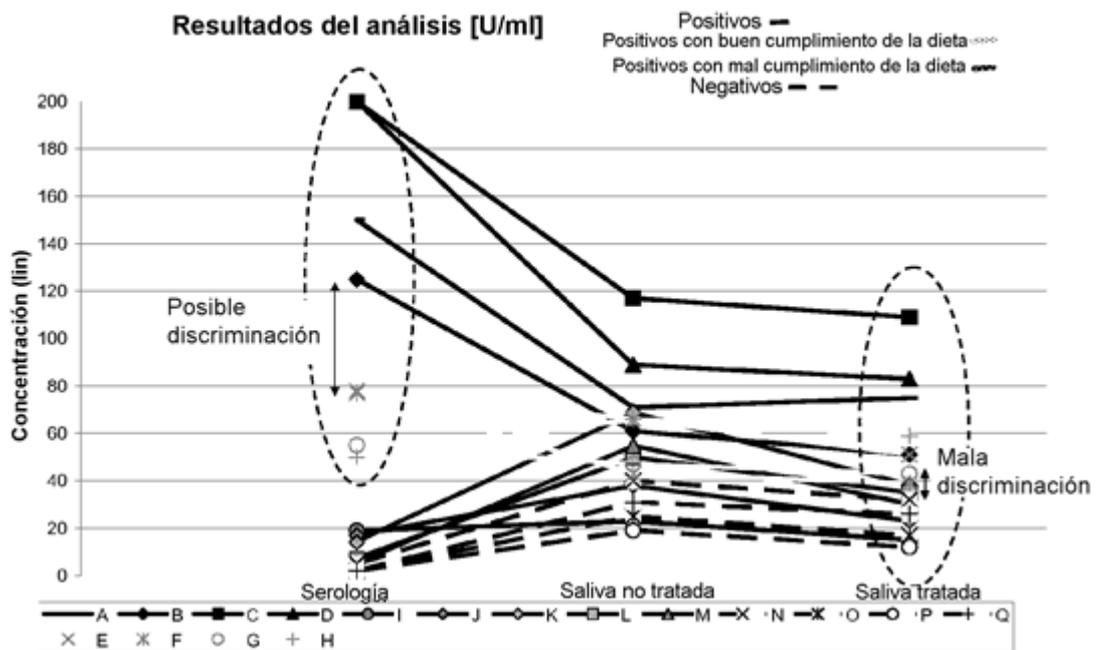


FIG. 5

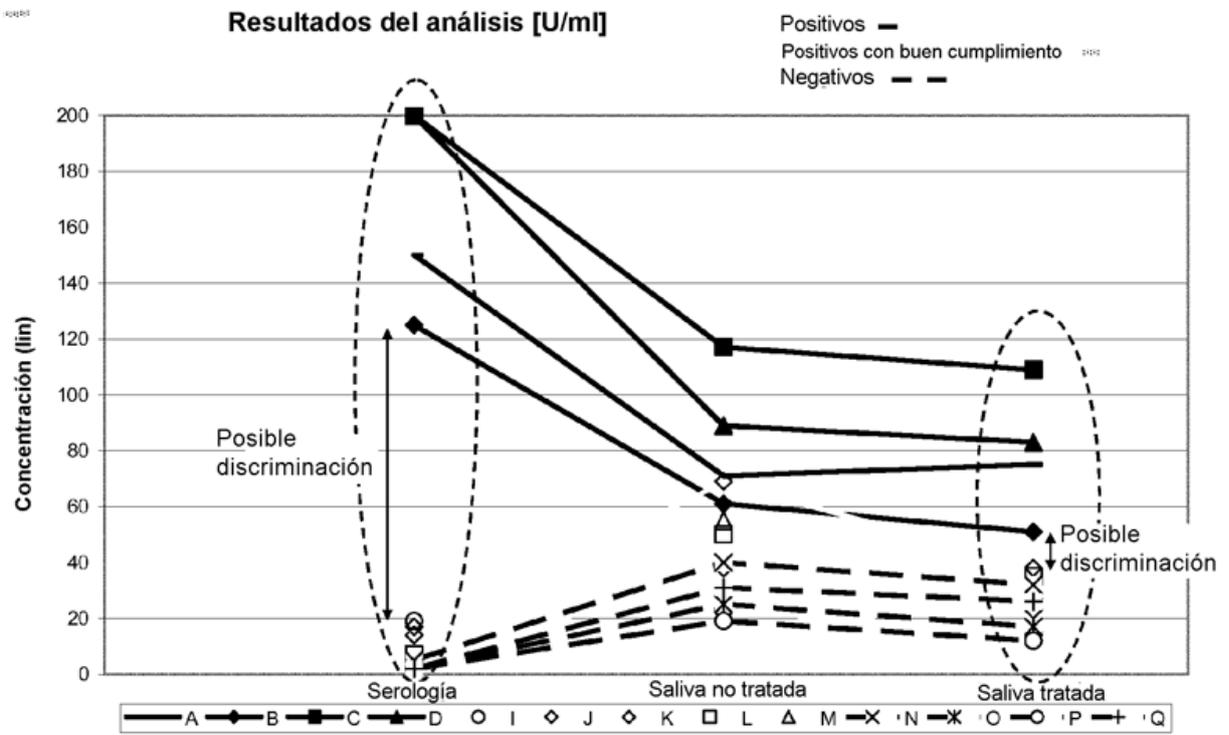


FIG. 6

A

B

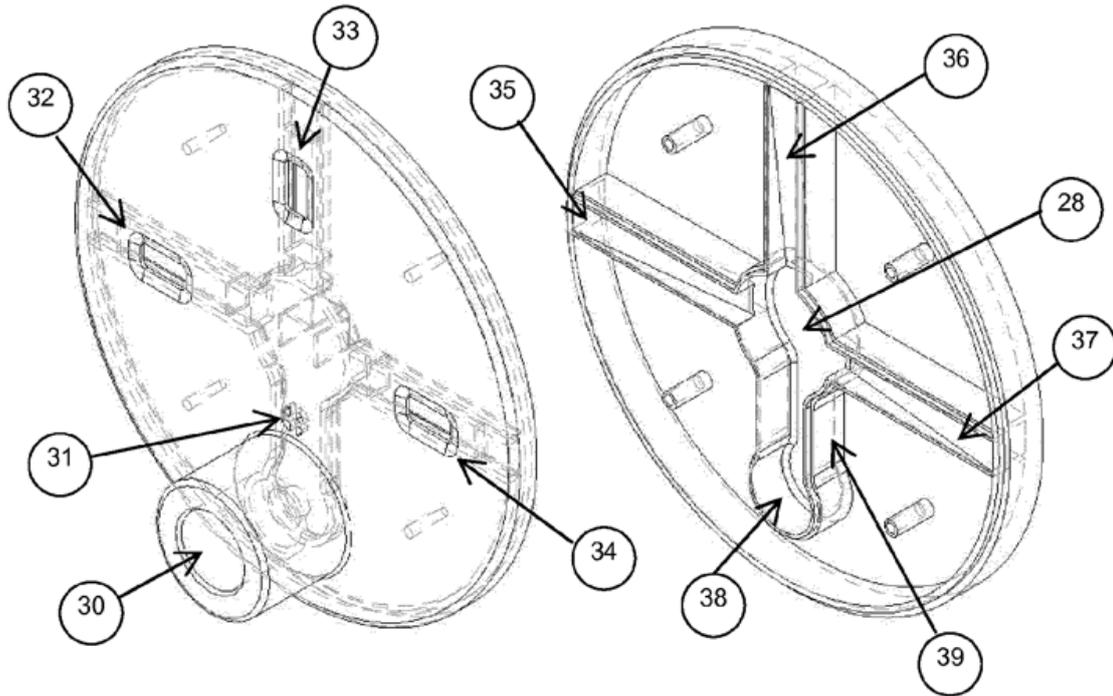


FIG. 7

