

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 214**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2008** **E 08805353 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 2184605**

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

30 Prioridad:

**27.07.2007 ES 200702152**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.05.2016**

73 Titular/es:

**INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA APLICADA, S.A.**  
**(100.0%)**  
**HERMANOS GARCÍA NOBLEJAS, 39**  
**28037 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**VELA OLMO, CARMEN;**  
**VENTEO MORENO, ÁNGEL ANTONIO y**  
**SANZ FERNÁNDEZ, ANTONIO JOSÉ**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 569 214 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

Inmunoensayo de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos.

### Campo de la invención

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

### Antecedentes de la invención

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

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

20 Los inmunoensayos permiten identificar antígenos (técnicas directas) o anticuerpos frente a un antígeno (técnicas indirectas). Entre estas técnicas indirectas se encuentran los inmunoensayos indirectos y los inmunoensayos de bloqueo o competición. Los inmunoensayos indirectos, a pesar de tener una elevada sensibilidad, presentan problemas de especificidad por los falsos positivos obtenidos, normalmente por los problemas de fondo inespecífico. Además, no permiten detectar IgM porque normalmente se usan anticuerpos anti-IgG, por lo que no detectan a los animales positivos hasta las 2-3 semanas post-infección o post-vacunación. Los inmunoensayos de bloqueo o competición, en general, son más específicos que los inmunoensayos indirectos pero menos sensibles.

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

35 La Lengua Azul es una enfermedad causada por el virus de la Lengua Azul (BTV, del inglés "Blue Tongue Virus"), un arbovirus (virus transmitido por artrópodos) que infecta de forma natural a rumiantes domésticos y salvajes, camélidos y algunos otros herbívoros, tales como elefantes, aunque la enfermedad afecta casi exclusivamente a las ovejas, originando cursos clínicos agudos o subagudos. En vacas y cabras, la enfermedad clínica es rara y, cuando se presenta, es mucho más suave que en ovejas. La oveja afectada puede morir después de una enfermedad aguda o crónica, o puede recuperarse con pérdida de peso y/o roturas de lana. BTV es el virus prototípico del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*). El genoma de BTV incluye 10 segmentos diferentes de ARN bicatenario (ARN<sub>bc</sub>) que codifican para 7 proteínas estructurales (VP1 a VP7) y 4 proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3 y NS3a). El núcleo interno de BTV está formado por 2 proteínas mayoritarias (VP3 y VP7) y por 3 proteínas minoritarias (VP1, VP4 y VP6) y está rodeado por una cápsida externa formada por VP2 y VP5 (documento WO 2008/030282).

40 Actualmente existen 24 serotipos de BTV reconocidos. Las pruebas recomendadas para la detección de anticuerpos y serogrupos específicos de BTV incluyen la inmunodifusión en gel de agar y un ELISA competitivo, preferentemente éste último debido a su mayor exactitud y adaptación a pruebas rápidas convencionales de laboratorio y tecnología de lectura. La prueba recomendada para detectar anticuerpos de serotipos específicos del BTV es la prueba de neutralización.

50 El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV, del inglés "Porcine Reproductive and Respiratory Virus") es un arterivirus que causa el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). Dicho virus puede causar problemas reproductivos importantes en cerdas adultas que pueden terminar en abortos así como problemas respiratorios, entre otros, en cerdos neonatos o en cerdos en desarrollo. La patente europea EP 952219 B1 describe un método para el diagnóstico de PRRSV que comprende poner en contacto una muestra biológica de un animal con una proteína de fusión recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV fusionada a un fragmento de la proteína del gen 10 del fago T7.

Fehrsten evalúa dos fragmentos de anticuerpo de pollo de Fv de cadena sencilla (scFv) específicos de BTV de

serotipo 10 en un ELISA de competición para la detección de anticuerpos frente a BTV (Fehrsen J *et al.* 2005 J Virol Methods 129: 31-39). Lunt describe un ELISA de bloqueo que incorpora el anticuerpo monoclonal 20E9B7G2 para la detección de anticuerpos frente a BTV (Lunt RA *et al.* 1988 J Gen Virol 69: 2729-2740). La solicitud de patente internacional WO 91/10136 A1 describe un método de diagnóstico de infección por lengua azul en un animal que comprende poner en contacto una muestra que contiene anticuerpo con un reactivo de antígeno que comprende al menos un epítipo de la proteína de lengua azul VP6 y detectar la unión del anticuerpo a dicho reactivo de antígeno. La solicitud de patente internacional WO 2007/052238 A2 describe un antígeno quimérico que incluye un polipéptido Vp7 de orbivirus, así como un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar el antígeno quimérico a un sujeto. La solicitud de patente internacional WO 2006/093797 A2 describe métodos, dispositivos y kits para la detección del virus del PRRS basándose en un agente que se une a la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV. La solicitud de patente internacional WO 2006/091824 A2 describe composiciones y métodos para la detección y cuantificación de anticuerpos frente a PRRSV basándose en polipéptidos.

### **Compendio de la invención**

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

El inmunoensayo proporcionado por esta invención ha sido denominado "inmunoensayo de doble reconocimiento" ya que comprende el reconocimiento y unión de dos unidades del antígeno diana al anticuerpo específico de dicho antígeno diana, uno de ellos formando parte de un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador, en el que el antígeno diana es un antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*. Dicho inmunoensayo ha sido validado en sueros de referencia para los 24 serotipos de virus de lengua azul (BTV) reconocidos (Ejemplo 1) así como en la detección de anticuerpos específicos del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (Ejemplo 3) y posee una elevada especificidad y sensibilidad, tal como se pone de manifiesto en el Ejemplo 2.

Dicho inmunoensayo de doble reconocimiento se puede utilizar para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de antígenos de organismos patógenos en una muestra de ensayo de un sujeto, en el que el antígeno diana es un antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*, y, de este modo, diagnosticar la infección causada por un organismo, tal como un organismo patógeno en un sujeto susceptible de ser infectado por dicho organismo, preferentemente, en un ser humano.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un inmunoensayo para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra que comprende poner en contacto dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dicho anticuerpo específico de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, y detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, en el que el antígeno diana es un antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*. En una realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo específico de BTV, mientras que en otra realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo específico de PRRSV.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un soporte que comprende un antígeno diana y un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador, en el que el antígeno diana es un antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*. En una realización particular, dicho antígeno diana es un antígeno de BTV, mientras que en otra realización particular, dicho antígeno diana es un antígeno de PRRSV.

### **Descripción detallada de la invención**

En un aspecto, la invención se relaciona con un inmunoensayo, en adelante inmunoensayo de la invención, para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra que comprende:

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

en el que el antígeno diana es un antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*.

El inmunoensayo de la invención permite detectar anticuerpos específicos de antígenos diana en una muestra de ensayo. Un anticuerpo es una inmunoglobulina producida por células de la serie de los linfocitos B y secretadas por

células plasmáticas en respuesta a una estimulación por un antígeno, que reconoce específicamente dicho antígeno y es capaz de unirse selectivamente a dicho antígeno.

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

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

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de antígenos bacterianos incluyen antígenos de bacterias patógenas de animales, incluyendo seres humanos, tanto Gram positivas como Gram negativas. Ejemplos específicos de bacterias patógenas incluyen: *Actinomyces israelii*, *Bacillus aratraxis*, *Bacteroides* sp., *Bordetella* sp., *Borelia burgdorferi*, *Brucella* sp., *Campylobacter* sp. (por ejemplo, *C. jejuni*), *Clostridium* sp. (por ejemplo, *C. perfringers*, *C. tetani*), *Corynebacterium* sp. (por ejemplo, *C. diphtheriae*), *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* sp. (por ejemplo, *K. pneumoniae*), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacteria* sp. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Neisseria* sp. (por ejemplo, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*), *Pasteurella* sp. (por ejemplo, *P. multocida*), *Pseudomonas* sp., *Rickettsia* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. (por ejemplo, *S. aureus*), *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus* sp. [por ejemplo, *S. pyogenes* (Grupo A de *Streptococcus*), *S. agalactiae* (Grupo B de *Streptococcus*), grupo *S. viridans*, *S. faecalis*, *S. bovis*, *Streptococcus* (sp. anaeróbicas), *S. pneumoniae*], *Treponema* sp. (por ejemplo, *T. pallidum*, *T. pertenue*), etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de antígenos de hongos incluyen antígenos de hongos patógenos de animales, incluyendo seres humanos, tales como *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de antígenos de protozoos y nematodos incluyen antígenos de protozoos y nematodos patógenos de animales, incluyendo seres humanos, tales como *Anaplasma marginale*, *Dirofilaria immitis*, *Leishmania* sp. (leishmaniasis), *Plasmodium* sp. (malaria) [por ejemplo, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*], *Schistosoma* sp., *Toxoplasma* sp. (por ejemplo, *T. gondii*), etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de antígenos tumorales incluyen moléculas asociadas a un proceso tumoral o canceroso capaces de provocar una respuesta inmune cuando son presentadas en el contexto de una molécula del MHC. La selección de antígenos tumorales puede ser realizada por un técnico en la materia a la vista del estado de la técnica [Renkvist *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15 (2001)]. Ejemplos representativos, no limitativos, de dichos antígenos tumorales incluyen: GD2 (neuroblastoma); EGF-R (glioblastoma maligno); CD52 (leucemia); proteína gp100 de melanoma humano; proteína melan-A/MART-1 de melanoma humano; tirosinasa; proteína NA17-A nt; proteína Mage-3; proteína p53; proteína HPV16E7; (CD11c)-TRP2; WT1 (leucemia y tumores sólidos); HM1.24 (mieloma múltiple); mucina prostática (adenocarcinoma prostático); antígeno específico de próstata (PSA); antígeno SF-25 (adenocarcinoma de colon); antígenos asociados con tumores de vejiga; MART-1 (melanoma); antígenos tumorales asociados al cáncer de mama [por ejemplo, Her2, mamaglobina, CA 15.3, CA 27.9, MCA (antígeno asociado con carcinoma de tipo mucina), MSA (antígeno sérico mamario), BMA (antígeno mucínico), cerbB2, MUC1, cáncer de tiroides medular), etc.]; antígenos tumorales asociados al cáncer de ovario [por ejemplo, CA125, SCC (teratoma inmaduro), BHCG (coriocarcinoma), Her-2/neu, p21, etc.]; antígenos tumorales asociados al cáncer de pulmón [por ejemplo, CD40, gp160, Cyfra-21.1, Mage-A3, MUT-1, MUT-2, TPA, LAM8, SWA20, SCC (antígeno de carcinoma de células escamosas), etc.]; antígenos tumorales asociados al cáncer de piel [por ejemplo, p97, gp75, EMA, MTA, Mage-A1, Mage-A3, etc.]; antígenos tumorales asociados al cáncer de colon [por ejemplo,

COA-1, CA19.9, ND-4, CEA, TAG-72, CA72-4; antígenos tumorales asociados a tumores linfoides de células B [por ejemplo, CD19, CD20, etc.]; antígenos tumorales asociados a leucemia mieloide [por ejemplo, CD33, etc.], antígenos asociados a tumor en linfomas [por ejemplo, CD 30, HSP70, etc.], etc., y fragmentos antigénicos de dichos antígenos. Los antígenos tumorales pueden ser preparados a partir de células tumorales o cancerosas preparando extractos crudos de dichas células, por ejemplo, como describen Cohen, *et al.*, en *Cancer Research*, 54:1055 (1994), purificando parcialmente los antígenos, mediante tecnología recombinante o mediante síntesis *de novo* de antígenos conocidos.

Otros antígenos son alérgenos, es decir, sustancias a las que un sujeto es sensible y provocan una reacción inmunitaria, por ejemplo, extractos alérgenos de pólenes, extractos alérgenos de insectos, extractos alérgenos de alimentos o de productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o agujones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos alérgenos incluyen extractos alérgenos de gramíneas, arizónicas, platanáceas, olivo, etc. (incluyendo sus pólenes), extractos alérgenos de insectos (por ejemplo, ácaros del polvo, etc.), extractos alérgenos de alimentos o productos alimenticios (por ejemplo, gliadinas, gluten, pescado, marisco, frutas, etc.). Prácticamente cualquier alérgeno puede ser utilizado en la puesta en práctica del inmunoensayo de la invención para detectar anticuerpos específicos de dicho alérgeno (antígeno diana).

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

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

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

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

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

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

El término "marcador", tal como aquí se utiliza, se refiere a un reactivo indicador que permite detectar el complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, tal como una enzima que cataliza una reacción detectable, un compuesto que genera una señal cuando forma parte del complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho marcador puede ser una enzima (por ejemplo, peroxidasa, glicosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, etc.), un compuesto fluorescente o fluoróforo (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, etc.), un compuesto (químico)luminiscente (por

ejemplo, dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio, luminol, etc.), elementos radiactivos (azufre, yodo, etc.), etc. En una realización particular, dicho marcador es una peroxidasa. La selección de un marcador particular no es crítica, siempre y cuando sea capaz de producir una señal por sí mismo o conjuntamente con unas o más sustancias adicionales.

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

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

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

- 15 • Para la fosfatasa alcalina:

Cromogénico: sustratos basados en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/azul de nitrotetrazolio (BCIP/NPT), etc.

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

- 20 • Para peroxidasas:

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

25 Fluorogénico: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas y benzotiazinas reducidas, incluyendo el reactivo Amplex<sup>®</sup> Red, Amplex UltraRed, dihidroxantenos reducidos, etc.

- Para glicosidasas:

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

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

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

35 El inmunoensayo de la invención también puede ser utilizado para determinar la cantidad (cuantificar) de anticuerpos específicos de un antígeno diana en una muestra de ensayo ya que, con muchos marcadores, por ejemplo, enzimas, la cantidad de anticuerpo presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada.

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

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

50 y/o similares.  
En una realización particular, el antígeno diana se inmoviliza, directa o indirectamente, sobre un soporte, tal como un

pocillo de una placa de microtitulación. La muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos específicos de dicho antígeno diana se incuba con dicho antígeno diana durante un periodo de tiempo y bajo condiciones apropiadas para que se formen complejos antígeno-anticuerpo. Después de lavar el pocillo para retirar los reactivos no unidos al antígeno, se añade un conjugado que comprende dicho antígeno diana unido a un marcador y se deja  
 5 incubarse durante un periodo de tiempo y bajo condiciones apropiadas para que se formen complejos antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador. Tras lavar para retirar los reactivos no unidos, se procede a revelar la formación de dichos complejos antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador. La detección de dichos complejos antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador es indicativa de la presencia de anticuerpos específicos de dicho antígeno diana en la muestra de ensayo. Este tipo de ensayo permite además, si se desea, cuantificar la cantidad de anticuerpos específicos del antígeno diana en la muestra de ensayo.  
 10

La formación del complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador es indicativa de la presencia de anticuerpos específicos del antígeno diana en la muestra de ensayo. Por tanto, el inmunoensayo de la invención se puede utilizar para diagnosticar la infección causada por un organismo, tal como un organismo patógeno (por ejemplo, virus, bacteria, hongo, protozoo, nematodo, etc.), en un sujeto susceptible de ser infectado por dicho organismo. Tal  
 15 como aquí se utiliza, "sujeto" incluye a cualquier animal, incluido el ser humano, en particular, animales vertebrados, preferentemente mamíferos, tales como caballos, cerdos, conejos, gatos, ovejas, perros, vacas, seres humanos, etc.

En una realización particular, el inmunoensayo de la invención puede ser utilizado para diagnosticar la infección causada por BTV en animales susceptibles de ser infectados independientemente de que desarrollen o no sintomatología clínica (los cuales pueden actuar como reservorios), por ejemplo, ganado ovino, bovino, caprino,  
 20 felino, etc.

Por tanto, en una realización concreta, el inmunoensayo de la invención permite detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos frente a BTV en muestras de ensayo procedentes de animales susceptibles de ser infectados por BTV mediante un ELISA (Ejemplo 1) que comprende poner en contacto un antígeno de BTV inmovilizado sobre un soporte con una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos específicos de BTV;  
 25 en caso de que dicha muestra de ensayo tenga dichos anticuerpos, estos se unirán al antígeno de BTV. A continuación, tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade de nuevo el mismo antígeno de BTV conjugado a un marcador (conjugado de antígeno/marcador) y, en caso de que la muestra de ensayo contuviera anticuerpos frente a dicho antígeno de BTV, dichos anticuerpos podrían capturar el antígeno de BTV conjugado al marcador a pesar de estar unidos al antígeno de BTV inmovilizado sobre el pocillo. El complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador se detecta tras adición de un sustrato adecuado.  
 30

Prácticamente cualquier antígeno de BTV puede utilizarse en la puesta en práctica del inmunoensayo descrito anteriormente; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho antígeno de BTV es una proteína estructural BTV tal como VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7, o una combinación de dos o más de dichas proteínas estructurales; o una proteína no estructural de BTV tal como NS1, NS2, NS3, NS3a, o una  
 35 combinación de dos o más de dichas proteínas no estructurales; o, alternativamente, una mezcla de una o más proteínas estructurales de BTV con una o más proteínas no estructurales de BTV. Alternativamente, pueden utilizarse fragmentos antigénicos de dichas proteínas en lugar de proteínas completas, siempre que dichos fragmentos sean capaces de unirse a anticuerpos contra BTV, o proteínas de fusión que comprenden al menos una de dichas proteínas o uno de dichos fragmentos antigénicos de las mismas. Asimismo, dichas proteínas (y los fragmentos antigénicos) pueden ser tanto de origen nativo como de origen sintético o recombinante. En una realización específica no limitativa, dicho antígeno de BTV es una proteína recombinante VP7 de BTV (Ejemplo 1).  
 40

Prácticamente cualquiera de los soportes a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción puede utilizarse como soporte para poner en práctica el inmunoensayo descrito anteriormente; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho soporte sobre el que se inmoviliza un antígeno de BTV es un pocillo de una placa de microtitulación.  
 45

Asimismo, prácticamente cualquiera de los marcadores a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción, conjugado a un antígeno de BTV, puede utilizarse para poner en práctica el inmunoensayo descrito anteriormente; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho marcador es una enzima, tal como una peroxidasa [conjugado de antígeno de BTV/peroxidasa], en cuyo caso la detección del complejo antígeno de BTV-anticuerpo-antígeno de BTV/peroxidasa se realiza tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de la peroxidasa (por ejemplo, TMB).  
 50

En otra realización particular, el inmunoensayo de la invención puede utilizarse para diagnosticar la infección provocada por PRRSV en animales susceptibles de ser infectados por PRRSV independientemente de si desarrollan o no sintomatología clínica (reservorios), por ejemplo, ganado porcino, etc.

Por tanto, en una realización específica, el inmunoensayo de la invención permite detectar y, si se desea, cuantificar anticuerpos específicos contra PRRSV en muestras de ensayo de animales susceptibles de ser infectados por BTV por medio de un ELISA (Ejemplo 3) que comprende poner en contacto un antígeno de PRRSV inmovilizado sobre un soporte con una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos específicos de PRRSV; en caso de que dicha muestra de ensayo tenga anticuerpos, estos anticuerpos se unirán al antígeno de PRRSV. A continuación, tras  
 55

eliminar el material no unido mediante lavados, se añade de nuevo el mismo antígeno de PRRSV conjugado a un marcador (conjugado de antígeno/marcador) y, en caso de que la muestra de ensayo contuviera anticuerpos frente a dicho antígeno de PRRSV, dichos anticuerpos podrían capturar el antígeno de PRRSV conjugado al marcador a pesar de estar unidos al antígeno de PRRSV inmovilizado sobre el pocillo. El complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador se detecta tras adición de un sustrato adecuado.

Prácticamente cualquier antígeno de PRRSV puede utilizarse en la puesta en práctica del inmunoensayo descrito anteriormente; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho antígeno de PRRSV es una proteína estructural o no estructural de PRRSV, o una combinación de dos o más de dichas proteínas estructurales, o una combinación de dos o más de dichas proteínas no estructurales, o alternativamente una mezcla de una o más proteínas estructurales de PRRSV con una o más proteínas no estructurales de PRRSV. Alternativamente, pueden utilizarse fragmentos antigénicos de dichas proteínas en lugar de proteínas completas, siempre que dichos fragmentos sean capaces de unirse a anticuerpos contra PRRSV, o proteínas de fusión que comprenden al menos una de dichas proteínas o uno de dichos fragmentos antigénicos de las mismas. Asimismo, dichas proteínas (y los fragmentos antigénicos) pueden ser tanto de origen nativo como de origen sintético o recombinante. En una realización no limitativa específica, dicho antígeno de PRRSV es una proteína de fusión que comprende la proteína de nucleocápsida (N) de PRRSV (Ejemplo 3).

Prácticamente cualquiera de los soportes a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción puede emplearse como soporte para poner en práctica el inmunoensayo descrito anteriormente; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho soporte sobre el que se inmoviliza un antígeno de PRRSV es un pocillo de una placa de microtitulación.

Asimismo, prácticamente cualquiera de los marcadores a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción, conjugado a un antígeno de PRRSV, puede utilizarse para poner en práctica el inmunoensayo descrito anteriormente; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, dicho marcador es una enzima, tal como una peroxidasa (conjugado de antígeno de PRRSV/peroxidasa), en cuyo caso la detección del complejo antígeno de PRRSV-anticuerpo-antígeno de PRRSV/peroxidasa se realiza tras adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de la peroxidasa (por ejemplo, TMB).

También se da a conocer un inmunoensayo que se puede utilizar para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de antígenos tumorales en una muestra de ensayo de un sujeto, y, de este modo, diagnosticar la existencia de un tumor o de un cáncer en un sujeto, preferentemente, en un ser humano.

También se da a conocer un inmunoensayo que se puede utilizar para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de alérgenos en una muestra de ensayo de un sujeto, y, de este modo, diagnosticar la existencia de una reacción alérgica frente a dicho alérgeno en dicho sujeto, preferentemente, en un ser humano.

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

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

El inmunoensayo de la invención presenta una elevada especificidad y sensibilidad tal como se pone de manifiesto en el Ejemplo 2, en donde puede observarse que la especificidad del inmunoensayo de la invención aplicado a la detección de anticuerpos específicos de BTV es del 99,8% y la sensibilidad del 100%. Esta elevada sensibilidad parece ser debida a que el inmunoensayo de doble reconocimiento de la invención aúna las dos principales ventajas de los inmunoensayos indirectos y de competición ya que, por un lado, al igual que los inmunoensayos indirectos es capaz de detectar todo tipo de anticuerpo que se una a un antígeno diana (y no solo los anticuerpos que se unen a un epítipo determinado, como en los ensayos de competición), y, por otro lado, al igual que en los ensayos de competición (o bloqueo) se pueden usar elevadas cantidades de muestra en el ensayo (sin diluir o poco diluidas), lo que favorece la detección de positivos débiles (en los ensayos indirectos es muy raro que se utilicen diluciones de la muestra inferiores a 1/100). Asimismo, la elevada especificidad del inmunoensayo de la invención parece ser debida a que el antígeno diana debe ser reconocido dos veces por el mismo anticuerpo, la primera vez, cuando se pone en contacto con el antígeno diana inmovilizado sobre la fase sólida o soporte utilizado, y, la segunda vez, cuando se pone en contacto con el antígeno diana marcado (conjugado de antígeno diana unido a marcador), normalmente en solución o sin inmovilizar.

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

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante kit de la invención, que comprende:

- i) un soporte que comprende un antígeno diana; y
- ii) un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador, en el que el antígeno diana es un



antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*.

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

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

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

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

10 En una realización particular, el kit de la invención puede ser utilizado para diagnosticar la infección causada por BTV en animales susceptibles de ser infectados por dicho virus (por ejemplo, ganado ovino, bovino, caprino, felino, etc.) independientemente de que presenten o no sintomatología clínica (de hecho, una aplicación muy interesante del kit e inmunoensayo de la invención consiste en su empleo para identificar reservorios de organismos patógenos),  
 15 y comprende un soporte que comprende un antígeno de BTV y un conjugado que comprende dicho antígeno de BTV conjugado a un marcador y, opcionalmente, medios para revelar la presencia de complejo antígeno de BTV-anticuerpo-antígeno de BTV/marcador.

Prácticamente cualquier antígeno de BTV puede utilizarse en dicho kit; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho antígeno de BTV es una proteína estructural BTV tal como VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7, o una combinación de dos o más de dichas proteínas estructurales; o una proteína no  
 20 estructural de BTV tal como NS1, NS2, NS3, NS3a, o una combinación de dos o más de dichas proteínas no estructurales; o, alternativamente, una mezcla de una o más proteínas estructurales de BTV con una o más proteínas no estructurales de BTV. Alternativamente, pueden utilizarse fragmentos antigénicos de dichas proteínas en lugar de proteínas completas, siempre que dichos fragmentos sean capaces de unirse a anticuerpos contra BTV, o proteínas de fusión que comprenden al menos una de dichas proteínas o uno de dichos fragmentos antigénicos de  
 25 las mismas. Asimismo, dichas proteínas (y los fragmentos antigénicos) pueden ser tanto de origen nativo como de origen sintético o recombinante. En una realización específica no limitativa, dicho antígeno de BTV es una proteína recombinante VP7 de BTV (Ejemplo 1).

El soporte presente en dicho kit puede ser prácticamente cualquiera de los soportes a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular  
 30 dicho soporte sobre el que se inmoviliza un antígeno de BTV es una placa de microtitulación.

Asimismo, prácticamente cualquiera de los marcadores a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción puede utilizarse en dicho conjugado que comprende un antígeno de BTV y un marcador; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho marcador es una enzima, tal como una peroxidasa [conjugado de antígeno de BTV/peroxidasa], en cuyo caso dicho kit puede contener, si se desea, medios  
 35 para revelar la presencia del complejo antígeno de BTV-anticuerpo-antígeno de BTV/marcador (por ejemplo, TMB cuando el marcador es una peroxidasa).

En otra realización particular, el kit de la invención puede utilizarse para diagnosticar la infección provocada por PRRSV en animales que pueden ser infectados por dicho virus (por ejemplo, ganado porcino, etc.) independientemente de si presentan o no sintomatología clínica, y comprende un soporte que comprende un  
 40 antígeno de PRRSV y un conjugado que comprende dicho antígeno de PRRSV conjugado a un marcador, y opcionalmente medios para revelar la presencia del complejo antígeno de PRRSV-anticuerpo-antígeno de PRRSV/marcador.

Prácticamente cualquier antígeno de PRRSV puede utilizarse en dicho kit; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho antígeno de PRRSV es una proteína estructural o no estructural de PRRSV, o una combinación de dos o más de dichas proteínas estructurales, o una combinación de dos o más de  
 45 dichas proteínas no estructurales, o alternativamente una mezcla de una o más proteínas estructurales de PRRSV con una o más proteínas no estructurales de PRRSV. Alternativamente, pueden utilizarse fragmentos antigénicos de dichas proteínas en lugar de proteínas completas, siempre que dichos fragmentos sean capaces de unirse a anticuerpos contra PRRSV, o proteínas de fusión que comprenden al menos una de dichas proteínas o uno de dichos fragmentos antigénicos de las mismas. Asimismo, dichas proteínas (y los fragmentos antigénicos) pueden ser tanto de origen nativo como de origen sintético o recombinante. En una realización no limitativa específica, dicho antígeno de PRRSV es una proteína de fusión que comprende la proteína de nucleocápsida (N) de PRRSV (Ejemplo  
 50 3).

El soporte presente en dicho kit puede ser prácticamente cualquiera de los soportes a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular  
 55 dicho soporte sobre el que se inmoviliza un antígeno de PRRSV es una placa de microtitulación.

Asimismo, prácticamente cualquiera de los marcadores a los que se hizo referencia anteriormente en esta descripción puede utilizarse en dicho conjugado que comprende un antígeno de PRRSV y un marcador; no obstante, a modo de ilustración no limitativa, en una realización particular dicho marcador es una enzima, tal como una peroxidasa [conjugado de antígeno de PRRSV/peroxidasa], en cuyo caso dicho kit puede contener, si se desea, medios para revelar la presencia del complejo antígeno de PRRSV-anticuerpo-antígeno de PRRSV/marcador (por ejemplo, TMB cuando el marcador es una peroxidasa).

También se da a conocer un kit que se puede utilizar para detectar y, si se desea, cuantificar, anticuerpos específicos de antígenos tumorales en una muestra de ensayo de un sujeto, y, de este modo, diagnosticar la existencia de un tumor o de un cáncer en un sujeto, preferentemente, en un ser humano.

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

#### EJEMPLO 1

##### Ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos frente al virus de la Lengua Azul (BTV)

Con el objetivo de validar este ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento (ELISA DR) para detectar anticuerpos específicos frente a BTV se analizaron sueros de referencia para los 24 serotipos de BTV procedentes de diferentes orígenes.

##### Materiales y métodos

##### rVP7 de BTV (antígeno de BTV)

Como antígeno de BTV se utilizó la proteína recombinante VP7 (rVP7) de BTV (Basak, A.K., Stuart D.I. y Roy P. 1992. J. Mol. Bio. 228:687-689). Dicha proteína se obtuvo infectando células de *Spodoptera frugiperda* Sf-9 con un baculovirus recombinante que contenía la secuencia que codificaba la proteína VP7 de BTV y recogiendo el cultivo con elevado efecto citopático; tras lisar las células mediante choque osmótico, el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se purificó por intercambio iónico en FPLC (del inglés "Fast Protein Liquid Chromatography") y las fracciones que contenían la proteína se identificaron y valoraron mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 11% de acrilamida. La proteína rVP7 de BTV así obtenida y purificada se utilizó en el tapizado de la placa de poliestireno a una concentración determinada por ELISA en el rango 0,1-1 µg/ml.

##### Conjugado rVP7-HRPO

Para su uso como conjugado, la proteína rVP7 se dializó frente a tampón bicarbonato 0,1 M (pH 8,5) y se conjugó con peroxidasa (HRPO) (Horse Radish peroxidase, ROCHE) según el método descrito por Nakane & Kawaoi [Nakane, P.K. & Kawaoi, A. (1974). Peroxidase-labeled antibody: A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091] modificado. Cada proceso de marcaje generó un lote de producción de conjugado. Cada uno de los lotes de producción se almacenó diluido en solución salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4 y solución preservante 50% (v/v) Surmodics-TM (Diarect AG) y se almacenó a +4°C hasta su utilización.

##### Sueros

Con el fin de validar este ensayo, se analizaron sueros de referencia para los 24 serotipos de BTV procedentes de diferentes orígenes, siendo dichos orígenes:

- Laboratorio de Referencia Español (LRES) [Laboratorio Central de Veterinaria de Algete]: sueros de los serotipos 3, 10 y 19 de BTV;
- Laboratorio de Referencia de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) [Pirbright]: sueros de los 24 serotipos de BTV; y
- Laboratorio de Referencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA]: sueros de los serotipos 5, 10, 19 y 20 de BTV.

##### Controles

Como controles, se utilizaron sueros de control positivo para BTV y sueros de control negativo para BTV, procedentes de animales inmunizados o no con VP7 de BTV, respectivamente.

##### ELISA de doble reconocimiento (ELISA DR)

Se incuban placas de poliestireno de 96 pocillos con proteína rVP7 de BTV durante 18 horas a 4°C en tampón carbonato-BSA (seroalbúmina bovina), pH 9,6, con el fin de tapizar dichas con el antígeno de BTV (proteína rVP7). A continuación, las placas se lavan con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20, pH 7,4, se estabilizan durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C) en solución estabilizante Surmodics-TM (Diarect AG) y se secan. Las placas que

## ES 2 569 214 T3

no se van a utilizar inmediatamente se envasan de forma individual y se almacenan a 4°C.

- 5 A continuación, sobre las placas tapizadas con el antígeno de BTV se añaden los sueros a analizar a una dilución 1/2 en PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20 y se incuban durante 1 hora a 37°C. Tras lavar el material no adherido con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20, las placas se incuban con un conjugado rVP7-HRPO a una dilución predeterminada y valorada caso por caso, durante 1 hora a 37°C. Finalizado ese periodo de tiempo, las placas se lavan con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20 y la reacción se revela durante 15 minutos tras adición del sustrato TMB (tetrametilbencidina). Tras parar la reacción con ácido sulfúrico 0,5 M se realiza la lectura de la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA.

### Resultados

- 10 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, en donde puede apreciarse que el ensayo proporcionado por esta invención (ELISA DR) es capaz de reconocer todos los serotipos de BTV para los que existen sueros de referencia en distintos Laboratorios de Referencia (véanse el apartado relativo a Sueros). Asimismo, dichos resultados ponen de manifiesto que dicho ELISA DR es lo suficientemente específico y sensible como para reconocer todos los serotipos de BTV, independientemente del tipo que sean y/o del título que tengan.

- 15 Tabla 1

Análisis de sueros de referencia de 24 serotipos de BTV diferentes

Serotipo	ELISA DR		
	LRES	Pirbright	USDA
1		+	
2		+	
3	+	+	
4		+	
5		+	+
6		+	
7		+	
8		+	
9		+	
10	+	+	+
11		+	
12		+	
13		+	
14		+	
15		+	
16		+	
17		+	
18		+	
19	+	+	+
20		+	+
21		+	
22		+	
23		+	
24		+	

### EJEMPLO 2

Especificidad y sensibilidad del ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos frente a BTV utilizando sueros de campo

- 20 2.1 Especificidad utilizando sueros de campo

- 25 Para determinar la especificidad del ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento (ELISA DR) para la detección de anticuerpos frente a BTV, se realizaron estudios de campo con 758 sueros procedentes de granjas libres de BTV. Se analizaron sueros de vaca y de oveja. El protocolo seguido fue el descrito en el Ejemplo 1 (ELISA DR). Los resultados obtenidos mostraron una única muestra positiva con valores de densidad óptica (DO) cercanos al punto de corte (establecido tras determinar la señal de fondo de los sueros negativos de campo y observar la diferencia con la señal obtenida por un suero positivo límite preparado en el laboratorio, ajustando el ensayo para que dicha diferencia sea al menos de 0,3 puntos de absorbancia) indicando una especificidad del 99,8%.

2.2 Sensibilidad utilizando sueros de campo

- 5 Para determinar la sensibilidad del ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento (ELISA DR) para la detección de anticuerpos frente a BTV, se realizaron estudios de campo con 758 sueros procedentes de granjas libres de BTV. Siguiendo el protocolo descrito en el Ejemplo 1 (ELISA DR) se analizaron un total de 288 sueros de vaca y de oveja previamente caracterizados como positivos por otras técnicas tales como seroneutralización y otros ensayos ELISA. Todos ellos resultaron positivos indicando una sensibilidad del 100%.

EJEMPLO 3

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

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

Materiales y métodos

P10-N (antígeno de PRRSV)

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

Conjugado (P10-N)-HRPO

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

25 Sueros

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

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

- 30 Se añaden 100 µl de cada uno de los sueros problema a la dilución 1/100 en los pocillos y se incuba durante 1 h a 37°C. A continuación, la placa se lava 4 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20. Seguidamente se añaden 100 µl de anticuerpo específico de IgG de cerdo conjugado con peroxidasa a una dilución predeterminada a cada pocillo, se tapa la placa y se incuba durante 45 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Posteriormente, se lava la placa 5 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20, se añaden 100 µl de sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en cada pocillo y la reacción se mantiene durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 100 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% para parar la reacción y se lee la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.

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

- 40 Se añaden los sueros problemas a una dilución ½ en los pocillos y se incuba durante 1 h a 37°C. A continuación, la placa se lava 4 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20. Seguidamente se añaden 100 µl de anticuerpo monoclonal específico de la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV conjugado con peroxidasa a una dilución predeterminada y se incuba durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se lava la placa 5 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20, se añaden 100 µl de sustrato ABTS en cada pocillo y la reacción se mantiene durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 100 µl de SDS al 2% para parar la reacción y se lee la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.

Ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento (ELISA DR)

- 50 Se incuban placas de poliestireno de 96 pocillos con proteína de fusión P10-N (antígeno de PRRSV) durante 18 horas a 4°C en tampón carbonato pH 9,6-BSA (seroalbúmina bovina) con el fin de tapizar dichas con el antígeno de PRRSV (proteína de fusión P10-N). A continuación, las placas se lavan con PBS conteniendo 0,05% de Tween® 20 pH 7,4, se estabilizan durante 1 hora a temperatura ambiente en solución estabilizante (Surmodics-TM, Diarect AG) y se secan. Las placas que no se van a utilizar inmediatamente se envasan de forma individual y se almacenan a

4°C.

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

**Resultados**

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

Tabla 2

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

Valores de Absorbancia*		
ELISA de doble reconocimiento [ELISA DR]	INGEZIM® PRRS EUROPA 1.1.PRS K1 [ELISA indirecto]	INGEZIM® PRRS COMPAC 1.1.PRS K3 [ELISA de bloqueo]
<b>1,186</b>	<b>0,499</b>	<b>0,1715</b>
<b>1,86</b>	<b>0,8365</b>	<b>0,2045</b>
<b>3,071</b>	<b>1,4325</b>	<b>0,0965</b>
0,212	0,2225	1,0515
<b>0,437</b>	<b>0,37</b>	0,9945
0,214	0,151	1,1335
<b>1,423</b>	<b>0,7005</b>	<b>0,193</b>
<b>1,241</b>	<b>0,4605</b>	1,391
0,22	<b>0,566</b>	1,2915
0,212	<b>0,561</b>	1,19
0,205	0,1155	0,971
<b>0,411</b>	0,206	1,285
0,319	0,2295	1,133
<b>1,209</b>	<b>0,4545</b>	<b>0,817</b>
<b>0,474</b>	<b>0,3945</b>	<b>0,7885</b>
0,183	0,166	1,1675
<b>0,909</b>	<b>0,3875</b>	<b>0,666</b>
<b>0,74</b>	<b>0,4795</b>	<b>0,726</b>
0,206	0,102	1,13
0,263	<b>0,3665</b>	0,9715
0,342	0,2145	0,9855
<b>1,048</b>	<b>0,4905</b>	<b>0,69</b>
<b>0,692</b>	0,2455	<b>0,8435</b>
<b>1,095</b>	<b>0,2635</b>	<b>0,7035</b>
<b>1,046</b>	<b>0,355</b>	1,2675
<b>0,833</b>	0,1495	0,994
<b>0,706</b>	<b>0,2845</b>	0,885
<b>1,777</b>	<b>0,383</b>	<b>0,854</b>
<b>1,24</b>	<b>0,5405</b>	1,0265
<b>1,009</b>	<b>0,4415</b>	<b>0,8255</b>
<b>1,306</b>	<b>0,425</b>	<b>0,447</b>

## ES 2 569 214 T3

<b><i>0,591</i></b>	0,223	1,18
<b>Punto de corte:</b> <b>0,3568</b>	<b>Punto de corte:</b> <b>0,256725</b>	<b>Punto de corte:</b> <b>0,8655</b>

\*Valores de absorbancia obtenidos sobre una colección de 36 sueros de campo.

En sombreado, negrilla y cursiva, se indican los sueros considerados positivos por cada uno de los ensayos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un inmunoensayo para detectar un anticuerpo específico de un antígeno diana en una muestra que comprende:
  - 5 a) poner en contacto dicho antígeno diana con una muestra sospechosa de contener dicho anticuerpo específico de dicho antígeno diana bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo;
  - b) añadir un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador; y
  - c) detectar dicho complejo antígeno-anticuerpo-antígeno/marcador,
- 10 en el que el antígeno diana es un antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*.
2. Inmunoensayo según la reivindicación 1, en el que dicho virus es virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) o virus de la lengua azul (BTV).
3. Inmunoensayo según la reivindicación 1, en el que dicha muestra sospechosa de contener anticuerpos específicos de dicho antígeno diana es una muestra biológica.
- 15 4. Inmunoensayo según la reivindicación 1, en el que dicho marcador es una enzima, un compuesto fluorescente o fluoróforo, un compuesto (químico)luminiscente o un elemento radiactivo.
5. Inmunoensayo según la reivindicación 4, en el que dicho marcador es una peroxidasa.
6. Inmunoensayo según la reivindicación 1, en el que dicho inmunoensayo es un inmunoensayo enzimático, un fluoroinmunoensayo, un luminoimunoensayo o un radioinmunoensayo.
- 20 7. Inmunoensayo según la reivindicación 6, en el que dicho inmunoensayo es un ELISA.
8. Un kit que comprende:
  - (i) un soporte que comprende un antígeno diana; y
  - (ii) un conjugado que comprende dicho antígeno diana y un marcador,
 en el que el antígeno diana es un antígeno de un virus que pertenece a la familia *Arteriviridae* o *Reoviridae*.
- 25 9. Kit según la reivindicación 8, para diagnosticar la infección causada por virus de la lengua azul (BTV), que comprende un soporte que comprende un antígeno de BTV y un conjugado que comprende dicho antígeno de BTV conjugado a un marcador, y, opcionalmente, medios para revelar la presencia de complejo antígeno de BTV-anticuerpo-antígeno de BTV/marcador.
- 30 10. Kit según la reivindicación 9, en el que dicho antígeno de BTV es una proteína recombinante VP7 de BTV (rVP7) y dicho conjugado comprende dicha proteína rVP7 de BTV conjugada a una peroxidasa, y comprende, además, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).
- 35 11. Kit según la reivindicación 8, para diagnosticar la infección causada por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) que comprende un soporte que comprende un antígeno de PRRSV y un conjugado que comprende dicho antígeno de PRRSV conjugado a un marcador, y, opcionalmente, medios para revelar la presencia de complejo antígeno de PRRSV-anticuerpo-antígeno de PRRSV/marcador.
- 40 12. Kit según la reivindicación 11, en el que dicho antígeno de PRRSV es una proteína de fusión que comprende la proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV y dicho conjugado comprende dicha proteína de fusión que comprende la proteína N de PRRSV conjugada a una peroxidasa, y comprende, además, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).