

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 446**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2009 PCT/EP2009/057547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09153293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2009 E 09765873 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2304055**

54 Título: **Detección de un analito en medio acuoso**

30 Prioridad:

**18.06.2008 DE 102008028908**

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

**31.03.2017**

73 Titular/es:

**IFP PRIVATES INSTITUT FÜR  
PRODUKTQUALITÄT GMBH (100.0%)  
Wagner-Régeny-Strasse 8  
12489 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**WEBER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 607 446 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

Detección de un analito en medio acuoso

5 ÁMBITO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un kit de prueba basado en una tira de prueba para la detección cromatográfica de un complejo inmunológico con el analito.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

Los inmunoensayos de flujo lateral combinan sinérgicamente la velocidad de la cromatografía de capa fina con la selectividad, la especificidad y la sensibilidad de métodos de detección inmunológicos. Están disponibles como tiras de prueba para el más amplio rango de aplicaciones. Permiten una detección específica de sustancias antigénicas y biomoléculas. Proteínas, péptidos, anticuerpos, antígenos, inmunógenos, antígenos autoinmunes, carbohidratos, patógenos y gérmenes (bacterianos, parasitarios, virales, fúngicos, micotóxicos o tóxicos), ácidos nucleicos, ADN, ARN, oligo y polinucleótidos, y productos de PCR pueden citarse como ejemplos. Las tiras de prueba están disponibles con sistemas de detección de diferente sensibilidad e integradas en sistemas que facilitan la evaluación del análisis (véase el documento EP 0291194 B2 y sus referencias). Las tiras reactivas también son utilizadas para la caracterización e identificación de productos alimenticios, por ejemplo, en la determinación del tipo y origen del pescado (véase el documento WO 2002/042416 y sus referencias).

Las tiras de prueba para la detección de complejos hapteno-antihapteno forman un grupo particular, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 2002/0119497-A1. En estas pruebas, un receptor contra el primer hapteno se inmoviliza en la fase estacionaria de la cromatografía de capa fina en la llamada zona de detección. Por encima de la capa de separación - una fina capa de un material granulado muy fino como gel de sílice, diatomita, óxido de aluminio, celulosa - una almohadilla de adsorción está dispuesta en la dirección de movimiento cromatográfico para la adsorción de la fase móvil y, antes de eso, una zona de control con un receptor contra el anticuerpo antihapteno. La muestra se aplica en una región que se ha preparado con un anticuerpo antihapteno marcado con colorante. Los paquetes de prueba disponibles comercialmente comprenden, aparte de la tira de prueba, recipientes con anticuerpos contra el analito, que se conjugan con los correspondientes haptenos de reporte. Durante la prueba, la muestra se dispersa y se recoge en un tampón de lisis o elución. Si es necesario, esto continúa con una purificación parcial del analito. A continuación, se añaden dos anticuerpos contra el analito de muestra que están acoplados a diferentes haptenos de reporte, y se forma un complejo inmunológico en sándwich marcado con dos haptenos, pero sólo si hay algún analito presente en la muestra. El complejo de detección, doblemente marcado con haptenos, puede detectarse en la tira de prueba después de un minuto. Un sistema hapteno-antihapteno particularmente común utiliza biotina y digoxigenina como haptenos de reporte.

Durante la separación cromatográfica en la tira de prueba, los anticuerpos móviles antihapteno marcados con colorante impregnados en la zona de marcado pre-preparada (por ejemplo, monoclonal-anti-digoxigenina-IgG de ratón marcado con partículas de oro) se unen entonces al complejo de detección en la zona de detección, y entonces el complejo de detección coloreado se concentra en una banda coloreada por un receptor antihapteno que se inmoviliza allí, por ejemplo, avidina o estreptavidina, que se une a la biotina en el complejo de detección. Una banda coloreada detectable representa la presencia de analito en la muestra.

En el ejemplo dado, los anticuerpos policlonales contra Fcg de ratón (anticuerpos IgG de cabra contra la región constante del anticuerpo IgG de ratón marcado con oro) serían inmovilizados en la zona de control y los anticuerpos móviles anti-digoxigenin marcados con oro se concentran en la misma. La formación de una banda coloreada en la dirección de separación por encima de la zona de detección representa una separación cromatográfica con éxito.

Entonces, la interpretación de la tira de prueba es llevado a cabo en general según la Tabla 1.

60

TABLA 1

	Zona de marcado	Banda de detección	Banda control	Resultado	Comentarios
5	+/-	—	—	Sin resultado	Manejo incorrecto de la tira de prueba
	—	xxx	xxx	Positivo	Alta concentración de analito en la muestra
10	+/-	xx	xxx	Positivo	La muestra contiene analito
	+/-	x	xxx	Debilmente Positivo	Baja cantidad de analito / formación inespecífica de complejo de detección
	+/-	—	xxx	Negativo	No analito o no formación de complejo
15	+/-	—	xx	Negativo/ No claro	No analito o no formación de complejo
	+/-	—	x	Sin resultado	Inhibición de la formación del complejo de detección y/o inhibición de la cromatografía (pH, inhibidores o sustancias caotrópicas); lamuestra contiene inmunoglobulinas de ratón.
20	+/-	x	—	Sin resultado	Cromatografía incompleta

No siempre es fácil juzgar correctamente el color y la intensidad de las bandas, en particular, cuando existe la expectativa de un resultado específico. La eliminación del factor humano es extremadamente importante para la fiabilidad práctica de una prueba, ya que las técnicamente simples tiras de prueba también deben ser utilizadas por personas no entrenadas o parcialmente entrenadas. Sin embargo, el entrenamiento intensivo no puede evitar el error humano, especialmente en caso de pruebas en serie, elevada rutina, por estrés, distracción o interrupción repentina. Por otro lado, hay que considerar los factores económicos y el coste y gasto de tiempo para el control.

Por lo tanto, se sugiere una variedad de marcos codificados en relación con tiras de prueba que están diseñados para ayudar a evitar errores de interpretación de las bandas. Además, se sugiere diseñar las bandas de color como signos más y menos (+/-) legibles. Aún así, quedan muchas posibilidades de errores, en particular, durante el tratamiento de la muestra y la producción del complejo de detección. Por lo tanto, el estado de la técnica constituye un problema.

Un objeto de la invención es proporcionar un kit de prueba basado en las mencionadas tiras de prueba para un complejo de detección de hapteno-antihapteno, en el que se descartan errores de manipulación e interpretación. En particular, un objeto es proporcionar un kit de prueba, que descubre errores sistemáticos en el tratamiento de la muestra y la formación del complejo de detección. Además, un objetivo de la invención es proporcionar un kit de prueba que permita un análisis de seguimiento en caso de duda y que, en particular, sea adecuado para el análisis rápido de productos alimenticios para alérgenos principales y gérmenes según las actuales directivas de la UE.

#### 45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCÓN

El problema se resuelve mediante un kit de prueba según la reivindicación 1 y el proceso en el que se basa. Las realizaciones preferidas pueden derivarse de las reivindicaciones dependientes.

50 El kit de prueba comprende una tira de prueba cromatográfica con una zona de marcado impregnada con anticuerpos o receptores móviles marcados contra una molécula de reporte, una zona de detección, en la que un primer receptor contra una molécula de reporte está unido a la fase estacionaria, y una zona de control, que está dispuesta después de la zona de detección en la línea cromatográfica y en la que un segundo receptor contra el anticuerpo o receptor móvil marcado está unido a la fase estacionaria, así como primeros y segundos receptores acoplados a moléculas marcadoras para la formación de un complejo de detección.

60 El kit de prueba se caracteriza además en que comprende primeros recipientes marcados para la recogida y colocación de tiras de prueba cromatográfica y segundos recipientes marcados para la recogida y colocación de segundas tiras de prueba cromatográfica, en el que los primeros recipientes marcados comprenden, cada uno, una cantidad conocida de analito seco, incrustado en una capa de trehalosa soluble en agua, que se seca sobre la pared de cada primer recipiente como una fina capa, de tal manera que, durante la reacción de la muestra con los receptores acoplados a la molécula de reporte, los receptores contra el analito entran en contacto con solución de muestra acuosa, que la capa soluble en agua con la cantidad conocida de analito se disuelve inmediatamente, y que en cada primer recipiente se forma un complejo de detección con la cantidad conocida de analito, que se

detecta durante el análisis cromatográfico del complejo de detección en la tira de prueba y actúa como control interno del procesamiento de la muestra, la formación del complejo y la separación cromatográfica, y en el que los segundos recipientes marcados no comprenden ningún analito.

5 Los receptores acoplados a molécula de reporte contra el analito son preferentemente anticuerpos, preferentemente anticuerpos policlonales o diferentes anticuerpos monoclonales, los cuales están acoplados a las correspondientes moléculas de reporte. Lectinas pueden ser usadas como receptores para la detección de glicoconjugados. Las moléculas de reporte son preferentemente elegidas entre marcadores y haptenos no radioactivos, tales como biotina, digoxigenina, estreptavidina, avidina, HRP (peroxidasa de rábano picante), fosfatasa alcalina, paranitrofenol, Texas red, fluorocromos, tales como fluoresceína, rodamina, cumarina, etc.

10 Se puede concebir un número ilimitado de complejos hapteno-antihapteno. Los haptenos se pueden visualizar con reactivos de marcado que reconocen hapteno si se utilizan anticuerpos primarios acoplados a hapteno (o lectinas para la detección de glicoconjugados). Marcadores ejemplares son AMCA, TRITC FITC, Cy2, Cy3 y Cy5, y en particular, partículas de oro. Particularmente preferidos son los anticuerpos marcados con oro contra el hapteno o la molécula de reporte pertinente. También pueden considerarse conjugados de estreptavidina y anti-biotina para la detección de anticuerpos primarios biotinilados, mientras que los conjugados anti-digoxina reaccionan fácilmente con la digoxigenina aglicona y, por lo tanto, son útiles para la detección de proteínas digoxigenadas (Hartig et al., J Neurosci. Methods 1996, 67, 89 - 95). Los procesos hapteno-antihapteno son ventajosos, entre otros, cuando el uso de anticuerpos secundarios contra ratones causaría la detección no deseada de inmunoglobulinas endógenas.

25 En una realización preferida, el anticuerpo o receptor marcado con colorante en la zona de marcado es un anticuerpo monoclonal de ratón contra digoxigenina marcado con oro. En el sistema biotina-digoxigenina, el primer receptor unido en la zona de detección de la fase estacionaria es, entonces, estreptavidina o avidina. El segundo receptor, unido a la fase estacionaria en la zona de control, sería entonces, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra contra la región constante de la inmunoglobulina de ratón. El kit de prueba comprende entonces, a parte de las tiras de prueba preparadas, además anticuerpos digoxigenados y biotinilados contra el analito.

30 En una realización especialmente preferida, los primeros y segundos recipientes del kit de prueba comprenden, además, cantidades predeterminadas de anticuerpos acoplados a moléculas de reporte, incrustados en una capa de trehalosa en las paredes interiores de los recipientes, que se convierten en recipientes de reacción. Preferiblemente, los dos anticuerpos acoplados a hapteno se separan, y también se separan de la cantidad definida de analito control, y cada uno se seca sobre la pared del recipiente de muestra en una solución de trehalosa separada, con formación de capas vítreas. Los recipientes respectivos para la introducción de las muestras acuosas con el analito comprenden en la pared cantidades definidas de anticuerpos acoplados a hapteno contra el analito, incrustados en una fina capa vítrea de trehalosa. Preferiblemente, los anticuerpos acoplados a hapteno están presentes en cantidades equimolares, por lo que las diferencias en avidéz, especificidad y sensibilidad de los anticuerpos pueden compensarse, según sea el caso, adaptando las cantidades o la concentración final en la solución de muestra. El primer recipiente, el recipiente de control, comprende además una cantidad definida de analito de control, incrustado en una capa de trehalosa, además de los anticuerpos acoplados a hapteno.

45 Para llevar a cabo la prueba, la muestra a analizar se dispersa en primer lugar y se recoge en un tampón de lisis o elución. Si es necesario, se sigue un tratamiento o procesado adicional de la muestra o una purificación parcial del analito. A continuación, se introducen cantidades iguales de una solución de muestra en los primeros y segundos recipientes, el recipiente de control y el recipiente de prueba, se agitan brevemente los dos recipientes, de manera que se disuelven las capas de trehalosa con los anticuerpos o con el analito de control. Después del tiempo de incubación predeterminado con los anticuerpos, las dos tiras de prueba se colocan en la solución de muestra y las bandas se leen tras el finalizado de la cromatografía de capa fina.

50 Alternativamente, los anticuerpos contra el analito acoplados a hapteno o digoxigenados y biotinilados pueden añadirse a ambas soluciones de muestra. Esto es menos preferido, sin embargo, puesto que la adición de dos soluciones a dos recipientes de reacción es problemático, en vista de la eliminación del factor humano. Las pruebas seriadas con un alto número de muestras próximas unas a otras requieren, entonces, una concentración extremadamente alta, y todo ocurre fácilmente con la pérdida de un recipiente de reacción, que un recipiente de reacción diferente obtiene dos adiciones, que un tercer recipiente recibe la cantidad doble de un reactivo, pero no el otro, y así sucesivamente.

60 En el kit de prueba de la invención con los recipientes de prueba de seguridad se descartan tales errores, porque para obtener un resultado correcto, sólo importa que los recipientes reciban una solución acuosa con la muestra a analizar. Se verá fácilmente si se introdujo o no un líquido en un recipiente, y la falta de líquido en un recipiente de muestra se indicaría por cromatografía sin trabajo adicional.

65

Hasta ahora, organizar inteligentemente los recipientes de posicionamiento y cromatografía para un inmunoanálisis de flujo lateral era desconocido. Hasta ahora, los anticuerpos marcados con hapteno para el complejo de detección se añadían siempre al recipiente con la muestra en forma líquida. La lógica de un análisis de seguimiento utilizando cromatografía de capa fina es que la detección del analito, del complejo de detección y del recipiente de posicionamiento para la cromatografía de capa fina ya forman parte del análisis mentalmente. Además, siempre existía el peligro de problemas de solubilidad y estabilidad en el caso de anticuerpos secos anti-analito acoplados a hapteno, y el peligro de que el complejo de detección no se pudiera formar. El secado de los anticuerpos acoplados a hapteno en el recipiente de posicionamiento y su combinación con un recipiente de control con una cantidad definida de analito de control son, por lo tanto, una solución elegante a los problemas.

Durante la cromatografía de capa fina, los anticuerpos marcados contra el primer hapteno (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de ratón marcados con oro anti-digoxigenina) de la zona de marcado impregnada se unen primero a un complejo de detección, y luego el complejo de detección marcado con oro se concentra en la tira de prueba en la dirección de separación cromatográfica en la zona de detección mediante el receptor, que se inmoviliza allí (por ejemplo estreptavidina, que se une a la biotina en el complejo de detección) en una banda de color típicamente rojo oro. Entonces, se puede leer la banda coloreada. En una banda en la zona de control se aplican anticuerpos policlonales anti-Fcg de ratón, por ejemplo, anticuerpos IgG de cabra contra la región constante del anticuerpo IgG de ratón, que se unen a los anticuerpos anti-digoxigenina marcados con oro de la fase móvil. La formación de una banda coloreada en la zona de control confirma que se consiguió una separación en la tira de prueba y que estaba presente una fase móvil líquida en el recipiente de posicionamiento. Sin embargo, la banda en la zona de control sólo confirma que la separación cromatográfica era, en principio, adecuada para detectar un complejo sándwich marcado con hapteno. Sólo el control en el recipiente de control y en la tira de control expone errores sistemáticos en el tratamiento de la muestra y la formación del complejo de detección. Al mismo tiempo, los errores en la realización se descartan por el kit de prueba, porque la prueba, en todas sus etapas de detección, está diseñada de tal manera que todos los pasos se llevan a cabo de una manera visiblemente lógica. En otras palabras, a pesar de la complejidad de la prueba, todos los pasos parecen lógicos, incluso para el usuario no entrenado, y son físicamente visibles, lo que aumenta la confianza en la prueba.

Además, la evaluación del experimento es más clara. La evaluación simultánea de una tira de muestra y una de control no permite lagunas en la evaluación, al contrario que las pruebas de tira única del estado de la técnica. El kit de prueba con los recipientes de muestra y los recipientes de control y las dos tiras de prueba revela cada error en la formación del complejo de detección y el tratamiento de la muestra. La Tabla 2 muestra la tabla de evaluación del kit de prueba reivindicado.

TABLA 2

	Tira de prueba	Zona de marcado	Banda de detección	Banda control	Evaluación / comentario
5	Recipiente de prueba	+/-	–	–	Manejo equivocado, no muestra líquida, Reacción negativa
	Recipiente control	+/-	–	–	
10	Recipiente de prueba	–	xxx	xxx	Analito en muestra positivo Reacciones de formación de complejo y detección positivas
	Recipiente control	–	xxx	xxx	
15	Recipiente de prueba	+/-	xx	xxx	Analito en muestra positivo Reacciones de formación de complejo y detección positivas
	Recipiente control	+/-	xxx	xxx	
20	Recipiente de prueba	+/-	x	xxx	Analito en muestra débilmente positivo Reacciones de formación de complejo y detección positivas
	Recipiente control	+/-	xxx	xxx	
25	Recipiente de prueba	+/-	–	xxx	Analito en muestra negativo Reacciones de formación de complejo y detección positivas
	Recipiente control	+/-	xxx	xxx	
30	Recipiente de prueba	+/-	–	xx	Error en el tratamiento de la muestra o presencia de un inhibidor, ya que reacciones de formación de complejo y detección son negativas
	Recipiente control	+/-	–	xx	
35	Recipiente de prueba	+/-	x	–	Error en el tratamiento de la muestra o reacción de detección, reacción de detección negativa
	Recipiente control	+/-	x	–	

Leyenda: XXX coloreado intenso; XX coloreado fuerte; X coloreado débil; -- sin coloreado; +/- sin coloreado o inespecífico

40 Por lo tanto, según la invención, la inmunocromatografía en las tiras de prueba y el tratamiento de la muestra están funcionalmente y visualmente acoplados en un recipiente de prueba y uno de control. Aunque se conoce la inclusión de controles internos en la química analítica, es nuevo acoplar el control interno con un recipiente que, según las instrucciones del usuario y el diseño, debe usarse como dispositivo de posicionamiento mecánico para una tira de prueba cromatográfica. Dado que los recipientes de muestra o dispositivos de

45 posicionamiento de las realizaciones especialmente preferidas comprenden además losm reactivos de detección esenciales, incluyendo el control interno, se descartan errores por confusión y pasar por alto la adición de reactivos de detección. Además, los recipientes de muestra y los recipientes de control pueden estar dispuestos como pares de recipientes o las tiras de prueba estándar pueden incluir códigos de color o códigos mecánicos, de modo que sólo pueden usarse conjuntamente con un recipiente específico (de muestra o de control).

50 El secado de anticuerpos conjugados con moléculas de reporte, proteínas de unión o aptámeros en forma estable como una capa vitrificada sobre la pared de recipientes de muestra es conocido en la técnica. Aunque existen muchas posibilidades de fijar capas vitrificadas sobre la pared de recipientes de muestra (véase, por ejemplo, US 5.098.893 de Franks et al., US 6.669.963 de Kampinga et al.) o para hacer que las biomoléculas sean más estables en masas vítreas de azúcar (véase por ejemplo Rachamachandran et al., en la 1st

55 Transdisciplinary Conference on Distributed Diagnosis and Home Healthcare, IEEE Piscataway, NJ, USA, 2006, US 5.593.824 de Tremi et Al.), tales procesos en combinación con la cromatografía de capa fina de complejos inmunológicos son desconocidos.

60 La cantidad conocida de analito o las cantidades requeridas de receptores conjugados con moléculas de reporte (anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, proteínas de unión, ARN, ADN, aptámeros) se pueden secar como una esfera en una capa vítrea sobre la pared interior del recipiente de muestra o control a partir de una solución acuosa a la que se había añadido entre 20 y 200 mMol/L de trehalosa. El secado del analito o la cantidad de receptor en una solución de trehalosa puede llevarse a cabo a temperatura elevada, preferiblemente a una temperatura

65 entre la temperatura ambiente y 45°C, y si es necesario, a presión ligeramente reducida, con el fin de acelerar el secado y la vitrificación. Según el estado de la técnica, también se añaden varios azúcares y macromoléculas con

el fin de adaptar adecuadamente la temperatura de transición vítrea (véase Aksan et al., Isothermal Desiccation and Vitriification Kinetics of Trehalose-Dextran Solutions in Langmuir 2004, 5521-5529) o con el fin de obtener perlas de reactivo vítreas, porosas, fácilmente solubles (véase US 5.593.824 de Tremil et al.).

5 Los procedimientos conocidos no son adecuados para todos los analitos, en particular, no para las moléculas de unión sensibles a la temperatura y los anticuerpos. Además, a menudo conducen a capas que sólo se disuelven lentamente, o en las que las biomoléculas deseadas están presentes en forma modificada. Según la invención, se aplican por separado soluciones de analito y/o receptores conjugados con molécula de reporte que comprenden 20 a 600 mM de trehalosa, preferiblemente 20 a 250 mM de trehalosa, en la pared interior del  
10 recipiente de muestra y de control como gotitas, entonces se congela por choque a  $-40^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente de  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $-100^{\circ}\text{C}$ , de manera que la trehalosa no cristaliza a partir de la solución, y después las gotitas se secan mediante calentamiento a temperatura ambiente, en lo que la humedad comprendida en las gotitas es sublimada. Por lo tanto, se obtienen capas o esferas de una estructura vítrea pero porosa en la pared interior, que se adhieren firmemente a la pared interior del recipiente y que no se separan ni migran de la pared durante el transporte o  
15 sacudida de los recipientes mientras son transportados y almacenados. Durante el proceso de secado, la trehalosa desplaza las moléculas de agua en los puentes de enlaces de hidrógeno con las biomoléculas, y las hace estables en la pared del vaso durante largos períodos. La congelación por choque de la solución provoca la formación de una capa vítrea de trehalosa que se adhiere firmemente a la pared del recipiente, sin fases procedimentales adicionales. La siguiente sublimación de la humedad de la capa sólida vitrificada asegura que es porosa y que, cuando se añade agua o solución acuosa de muestra, puede disolverse inmediatamente.

Si la concentración de trehalosa en la solución de partida se ajusta a un valor más alto, ya no puede cristalizar, y el secado con trehalosa también funciona sin la fase de congelación.

25 Un simple secado de la solución del reactivo, que contiene trehalosa a presión ambiente y  $37^{\circ}\text{C}$ , da entonces mejores resultados con respecto a la estabilidad a largo plazo y la re- solubilidad de las soluciones de anticuerpo. El tiempo de secado óptimo es, entonces, de aproximadamente 4 horas. Los tiempos de secado más largos se han mostrado perjudiciales.

30 Aún cuando no es preferible, las soluciones de anticuerpo también pueden secarse en soluciones concentradas salinas y tampón multiplicadas. Normalmente, los anticuerpos también permanecen estables y ávidos después del secado a partir de una solución de PBS quintuple, a pH 7.4 (1 x PBS = 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.24 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1000 ml de agua dest, pH 7.4 con HCl). Sin embargo, debe garantizarse que no se produzca ninguna migración de la sustancia seca y que no se formen complejos insolubles de fosfato.

35 Una variación adicional es hacer la reacción de formación del complejo de detección aparentemente visible, por ejemplo, mediante una reacción de coloración paralela e independiente de dos componentes secundarios. Los dos componentes de la reacción de coloración acompañante se secan preferiblemente sobre la pared del recipiente de reacción y de posicionamiento, separadamente de los anticuerpos acoplados a hapteno. Durante la disolución de los anticuerpos acoplados a hapteno para el complejo de detección en la solución de muestra, los componentes para la reacción de coloración acompañante también se disuelven y pueden reaccionar juntos. Preferiblemente, los componentes de la reacción de coloración adjunta se eligen de manera que el colorante resultante no sea cromatográficamente activo. Si, por ejemplo, la capa de separación cromatográfica contiene almidón o amilosa, los componentes para la reacción de coloración acompañante pueden ser complejo de yodo-  
40 pirrolidona y amilosa, que forman un compuesto de inclusión típicamente azul intenso. También se pueden usar colorantes de dos componentes o colorantes reveladores como componentes acompañantes. En muchos casos, la inclusión de colorantes de color intenso en la capa de trehalosa, preferiblemente colorantes que tienen un comportamiento de migración completamente diferente en la separación cromatográfica tales como colorantes de perileno, será suficiente.

50 Al proveer recipientes de prueba listos para usar con todos los reactivos y con o sin una cantidad conocida de analito de control según la invención, se puede realizar además un control ciego y uno positivo, incluso después de realizar la prueba y obtener un primer resultado. Esto permite comparar las bandas de color poco claras del experimento con las bandas del control ciego o del positivo, y permite la interpretación segura del seguimiento del primer resultado. Por supuesto, el control ciego y positivo puede llevarse a cabo desde el principio,  
55 lo que facilita considerablemente la realización de pruebas en serie. Las pruebas ciegas negativas y las positivas también son importantes para la determinación de los límites de detección. Estos también determinan una cantidad definida de un analito de control en la pared del recipiente de control.

60 Dado que la importancia de la protección del consumidor aumenta en toda Europa y en el mundo, ya no basta con probar los productos alimenticios respecto a la presencia o ausencia de un compuesto, sino que el análisis debe siempre realizarse en un sistema de referencia.

65 Además, los requisitos legales del control de calidad en la producción y uso de alimentos han aumentado sistemáticamente en los últimos años, y los productores y comerciantes de alimentos tienen que integrar

procedimientos de vigilancia de calidad amplios en sus procesos operativos. Esto comprende tanto pruebas analíticas como la implementación de sistemas de higiene y gestión de calidad.

5 El kit de prueba de la invención ofrece asistencia rápida y simple para muchos problemas pertinentes para el análisis y la higiene en las áreas de alimentos, forrajes para animales, aditivos alimentarios y productos orgánicos, ya que los límites analíticos son aseverables por el usuario a través del control interno preestablecido y el límite de detección, de tal manera que una evaluación de los productos alimenticios y su comerciabilidad dentro del marco legal puede llevarse a cabo con sistemas de tira de prueba. El sistema de kit de prueba según la invención es, por lo tanto, adaptable a pruebas de comercialización, pruebas químicas y microbiológicas, 10 comprobación de deberes de declaración legal (leche entera, huevo entero, avellana, almendra, combinación de avellanas y almendras, cacahuete, pistacho, cereza, garbanzos, alubias, macadamia, nuez, anacardo, mostaza, apio, soja, pescado en general y especies específicas, crustáceos y moluscos, granos y cereales), producción y pruebas de rutina, el análisis de la eliminación, pruebas microbiológicas de agentes causantes de deterioro, microorganismos patógenos o específicos de productos (salmonella, helicobacter, norovirus, clostridium, etc.), 15 pruebas biomoleculares (alérgenos, especies animales, antibióticos, SNC y EEB mediante sondas genéticas y técnicas de PCR), análisis de micotoxinas (detección de aflatoxinas, ocratoxina A, DON, patulina, zearalenona).

Otros usos son el diagnóstico directo de heces (por ejemplo, Salmonella, toxinas A/B de Clostridium difficile, norovirus, Helicobacter pylori, Clostridium, enfermedad celíaca, etc.) o análisis de orina (por ejemplo, legionella sertyp A-soluble protein y otros). A parte de la determinación definitiva y la presencia de un control interno, una clara ventaja del sistema de kit de prueba de la invención es su larga vida útil. En particular, no hay peligro de que los reactivos se sequen. Además, el sistema de kit de prueba ofrece la seguridad de que los reactivos están siempre presentes en las cantidades correctas y la relación correcta durante la prueba de la muestra. Durante la adición gota a gota de los reactivos siempre existía el peligro de pasar por alto, contar mal, intercambiar o derramar reactivos. 20 25

La invención y sus realizaciones se describen ahora con la ayuda de ejemplos y con referencia a las figuras adjuntas.

### 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 muestra una fotografía de tres tiras de prueba, en donde la tira de ensayo A probó una muestra con una cantidad de analito de control de la pared del recipiente de posicionamiento y de muestra, la tira de prueba B probó la misma muestra sin analito de control y la tira de prueba C es una muestra negativa (sin analito); 35

Fig. 2 muestra una representación esquemática del principio de detección;

Fig. 3a muestra una fotografía de dos tiras de prueba con muestras ciegas positivas y negativas, en la que la muestra ciega positiva (tira de prueba a la derecha) representa el límite inferior (límite de detección requerido) y la muestra ciega negativa (tira de prueba a la izquierda) no contiene ningún analito; 40

Fig. 3b muestra una fotografía de cuatro tiras de prueba con un par comparativo de muestra ciega negativa y muestra negativa (par de tiras de prueba a la izquierda) y un par comparativo de la muestra positiva y de la muestra positiva impregnada (par de tiras de prueba a la derecha). 45

Fig. 4 muestra una fotografía de dos tiras de prueba que representan el resultado de la determinación de la presencia de patógenos en muestras analíticas utilizando PCR, con un resultado de muestra negativo (tira a la izquierda) y una tira de control (tira a la derecha). 50

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El desarrollo de la prueba fiable y rápida según la invención comprende principalmente las siguientes fases: (i) inmunización de animales contra el analito y purificación de los anticuerpos; (ii) acoplamiento o conjugación de los anticuerpos purificados con moléculas de reporte adecuadas tales como biotina y digoxigenina; (iii) prueba de los anticuerpos producidos en tiras de prueba estándar, por ejemplo, tiras de prueba de biotina-digoxigenina, y con diversas muestras; y (iv) determinación del límite de detección. 55

En principio, el establecimiento de un sistema de tira de prueba es suficiente, ya que las mismas moléculas de reporte (por ejemplo biotina y digoxigenina) pueden usarse para la detección de diversas biomoléculas. Ahí radica el atractivo del sistema hapteno-antihapteno o de un sistema de tira de prueba basado en moléculas de reporte. Las tiras de prueba para la detección de complejos sándwich con los haptenos biotina y digoxigenina están comercialmente disponibles. De forma similar, paquetes para la biotilación y digoxigenación de proteínas, en particular de anticuerpos, o también de nucleótidos y azúcares, están disponibles. Ambos haptenos, biotina y digoxigenina, se utilizan también en la detección de ADN y ARN. En principio, la prueba según la presente invención no sólo puede utilizarse para la detección de un complejo de sándwich doblemente marcado con 60 65

hapteno, sino también para la detección de productos de PCR doblemente marcados con hapteno. En este caso, los dos cebadores para la reacción de PCR se marcan, cada uno, con un hapteno, por ejemplo, uno con biotina y uno con digoxigenina, de tal manera que el producto de PCR lleva ambos haptenos. El complejo de ácido nucleico con los dos haptenos puede entonces detectarse en cuestión de segundos usando cromatografía de capa fina. En este caso, el analito es ADN o ARN. La reacción con los receptores acoplados a la molécula de reporte corresponde a una PCR de ADN, durante la cual se incorporan cebadores marcados con hapteno en el producto de PCR.

Por supuesto, también pueden emplearse anticuerpos comercialmente disponibles contra los muchos diferentes analitos. Sin embargo, en todos los casos permanece una definición de los límites de detección y las sensibilidades, o del acoplamiento de los anticuerpos con las moléculas de reporte.

Otras ventajas y características de la invención pueden derivarse de los siguientes ejemplos.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1 *Kit de prueba para la determinación de huevo entero en productos alimenticios*

Las directivas 2003/89/CE y 2005/26/CE de la UE exigen a los productores de alimentos que indiquen en sus productos todos los ingredientes que puedan causar alergia o intolerancia alimentaria, independientemente de su proporción en los alimentos. Los llamados principales alérgenos se nombran en particular, incluyendo los granos que contienen gluten (trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut e híbridos de los mismos), crustáceos, huevos y ovoproductos, pescado, cacahuets, soja, leche, varios tipos de nueces (Almendro (*Amygdalus communis* L.), avellana común (*Corylus avellana*), nuez (*Juglans regia*), anacardo (*Anacardium occidentale*), nuez pecana (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), pistacho (*Pistacia vera*), nuez de macadamia y nuez de Queensland (*Macadamia ternifolia*), apio, mostaza, semillas de sésamo y sus productos, así como dióxido de azufre. Además, se deben revelar todos los ingredientes que representan más del 2% del producto alimenticio. La elección de los ingredientes a etiquetar corresponde a las alergias alimentarias y las intolerancias más frecuentes en Europa. En general, los alérgenos alimentarios tienen que ser indicados sin ningún límite en su cantidad, incluso si están presentes en trazas.

Como ejemplo representativo, una prueba fiable y rápida se desarrolló para la detección de huevo entero (huevos y productos de huevo) en los alimentos. El desarrollo incluyó las fases (i) inmunización de animales, obtención de un antisuero específico y purificación de la fracción de IgG del antisuero usando cromatografía de afinidad en una columna de proteína G; (ii) acoplamiento y marcado de anticuerpos purificados contra el analito con biotina y digoxigenina; (iii) prueba de los anticuerpos obtenidos en ensayos rápidos de tira de prueba preparada estándar de biotina-digoxigenina con diferentes muestras; (iv) adaptación y calibración del estándar interno, la cantidad de analito en la pared del recipiente de muestra, hasta el límite de detección requerido de la tira de prueba.

i) Producción del antisuero. Huevo entero industrial (100 mg en 1 mL agua dest) se emulsionó con 1 ml de adyuvante de Freund, y se utilizó para inmunizar ovejas tres veces en intervalos de seis semanas. Seis semanas después de la última inmunización, se recogió el suero bruto, se eliminaron los constituyentes grasos mediante deslipidización utilizando Aerosil (1.5%) y se precipitaron las inmunoglobulinas con sulfato de amonio (2M). El precipitado disuelto se dializó con KPO<sub>4</sub> 15 mM, NaCl 50 mM a pH 7.0 y seguido por purificación de la fracción de IgG en una columna Nab (columna y método por Pierce, Rockford, IL 61105, USA, Núm. Cat. 1940.1, "Protocolo de purificación por flujo de gravedad").

Las denominadas columnas de Nab portan proteínas bacterianas inmovilizadas A, G, A/G y L, que se unen a inmunoglobulinas de mamífero con alta especificidad. Finalmente, las pruebas empíricas mostraron qué columna era adecuada para qué tipo de anticuerpo. En particular, los anticuerpos se diluyeron en tampón de unión (fosfato 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 – tampón de unión de proteína de unión G-IgG –, Pierce, Núm. Cat. 21011), una columna de cromatografía de afinidad (Nab Protein G Spin Column, Pierce Núm. Cat. 89957) se condicionó con tampón de unión, se diluyó el antisuero en tampón de unión y se aplicó a la columna, después se lavó la columna con tampón de unión y se neutralizó, y la fracción de IgG se eluyó con tampón de elución (glicina 0.1 M, pH 2-3: tampón de elución Ag/Ab suave, Núm. Cat. 21027) y se fraccionó. La fracción con el mayor contenido de IgG se determinó fotométricamente a 280 nm, los anticuerpos purificados por afinidad se dializaron con PBS y posteriormente la solución se ajustó a una concentración de proteína de 1 mg/ml.

(ii) Acoplamiento de los anticuerpos purificados contra huevo entero con haptenos digoxigenina y biotina.

Una porción de los anticuerpos policlonales purificados anti-huevo entero se marcó con digoxigenina y la segunda porción con biotina. La digoxigenación se llevó a cabo usando un kit de marcaje con digoxigenina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim (DIG-Protein Labelling Kit, Núm. Cat. 11 367 200 001). En particular, se disolvió el éster de N- hidroxisuccinimida del ácido digoxigenina-3-O-succinil-ε-aminocaprónico (DIG-NHS) en 50 µl de DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo (1 ml) en una relación molar de 5:1 (1 molécula de anticuerpo por 5 moléculas DIG-NHS). La reacción se detuvo mediante la adición de L- lisina, y los anticuerpos se separaron por fraccionamiento en un Sephadex-G-25 y diálisis del exceso de reactivo de marcaje.

La biotilación se llevó a cabo usando un kit de marcaje de biotina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim (Biotin Protein Labelling Kit, Núm. Cat. 11 418 165 001). En particular, se disolvió éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinil- $\epsilon$ -aminocaprónico (biotina-7-NHS) en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpo (1 ml) en una relación molar de 5: 1 (1 molécula de anticuerpo por 5 moléculas de biotina-7-NHS; 2 horas a temperatura ambiente). La reacción se detuvo mediante adición de L-lisina y los anticuerpos se separaron por fraccionamiento en una Sephadex-G-25, seguido por una diálisis del exceso de reactivo de marcaje. Entonces, los anticuerpos digoxigenados y biotilados se ajustaron a 1 mg/ml de PBS, azida de sodio al 0,2 % y se congelaron.

(iii) Tiras de prueba de capa fina para cromatografía inmunológica. Se utilizaron tiras de prueba anti-biotina/anti-digoxigenina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim. En la tira de prueba se tiñe el hapteno de digoxigenina con anticuerpos anti-digoxigenina marcados con oro en la zona impregnada de la tira de prueba rápida. El complejo de sándwich teñido puede, entonces, ser detectado en la inmunocromatografía de capa fina a través de su unión a estreptavidina, como se ha descrito anteriormente (véase la figura 2).

iii) Prueba de los anticuerpos anti-huevo entero biotilados y digoxigenados en tiras de prueba rápida estándar de biotina-digoxigenina. Se homogeneizaron diferentes muestras de alimento triturado (cada una 0.5 g), con y sin huevo entero, en 40 ml de PBS durante 10 minutos a 60°C, se extrajeron y se retiraron los componentes sólidos por centrifugación. Para cada uno, se transfirieron 400  $\mu$ l de sobrenadante a un recipiente de reacción y se añadieron a cada uno de ellos 2.5  $\mu$ l de anticuerpo anti-huevo entero biotilado y digoxigenado. La muestra se mezcló y se dejó en reposo durante 10 minutos para la formación del complejo sándwich. Posteriormente, se colocaron tiras de prueba rápida en la solución y el resultado se leyó después de 4 minutos. La sensibilidad fue inferior a 1 mg de huevo entero por kg de muestra (1 ppm) y por lo tanto claramente más sensible que el ELISA convencional. Los alérgenos principales en los alimentos también deben declararse en la Unión Europea desde 1 ppm (véase la figura 1).

iv) Adaptación y calibración de los estándares internos al límite de detección requerido

(1 mg de huevo entero/kg). Diferentes composiciones alimenticias a partir de diferentes matrices (crema nougat, masa y productos de panadería, cultivos, bolas de harina y patatas, salsas listas, alimentos con nata, platos vegetales preparados, pan tostado, platos de pasta, helado, pan de jengibre, chocolate, productos azucarados y azúcar (caramelo), salsas listas, albóndigas de carne congeladas, fueron probadas con respecto a la cantidad declarada y la realmente presente de huevo entero. Se elaboraron estándares de huevo entero correspondientes a un contenido de 1 mg de huevo entero por kg de muestra, y se adaptaron a cada extracción de muestras como se sugirió. En el recipiente de control se diluyeron aproximadamente 10 a 100 ng de huevo entero (correspondiente a 1 a 10 mg por kg de producto alimenticio) en 5  $\mu$ l de PBS, se añadieron 45  $\mu$ l de trehalosa acuosa 100 mMol/L, las soluciones se mezclaron y se congelaron por choque a -60°C, y finalmente se secaron sobre la pared de la base del recipiente de control como una capa de vítrea mediante calentamiento a 40°C.

Entonces, tanto en los recipientes de muestra como en los recipientes de control se secaron 2.5  $\mu$ l de anticuerpos biotilados o digoxigenados mezclados con 22.5  $\mu$ l de trehalosa 100 mmol/L sobre las paredes en una capa vítrea adicional mediante congelación por choque a -60°C y calentamiento a 40°C. Dado que los anticuerpos marcados de forma diferente pueden formar juntos complejos insolubles, se secaron por separado sobre la pared lateral y la superficie inferior de la tapa del recipiente de reacción. Con el fin de hacer visible la reacción de anticuerpo, se secó una mínima cantidad de complejo de polivinilpirrolidona-yodo soluble en agua sobre la superficie inferior de la tapa junto a la solución de anticuerpo y una mezcla de trehalosa/amilosa sobre la pared lateral del recipiente.

(v) Inmunocromatografía. Entonces se añadieron 400  $\mu$ l de extracto de huevo entero a la muestra preparada y los recipientes de control, que fueron cerrados e invertidos varias veces con el fin de disolver los dos anticuerpos de las paredes, incluyendo el estándar interno. La formación paralela de característico color azul del compuesto de inclusión de amilosa de yodo al invertir los recipientes indicó que el recipiente de reacción con la muestra se había invertido, que ambos anticuerpos se habían disuelto y que el complejo de sándwich para la posterior detección en la cromatografía de capa fina pudo formarse. Después de un tiempo de reacción de 10 minutos, o después del completo desarrollo del color azul, se abrieron los recipientes de reacción y se colocó una tira de prueba en cada una de los recipientes de muestra y de control en paralelo. Dado que el material de separación estacionario de la tira de prueba rápida comprende almidón, así como diatormita, el compuesto de inclusión de yodo-amilosa azul no tomó parte en la cromatografía de capa fina y no pudo alterar el resultado. La presencia del complejo de detección se pudo determinar según la Tabla 2.

**Ejemplo 2** Kit de prueba para la detección de garbanzo

Las pastas de avellana se comercializan globalmente a gran escala y se utilizan en una amplia variedad de productos alimenticios. La pasta de avellana y otros productos de semillas oleaginosas tales como pulpa de almendras y pulpa de pistacho a menudo se mezclan y adulteran con pulpa de garbanzo, ya que los garbanzos son

mucho más baratos que las semillas oleaginosas. Una simple prueba rápida sería de gran interés para los importadores y productores de alimentos, a fin de protegerse de la mezcla y la adulteración. Se puso un objetivo de sensibilidad de al menos 0.1% (0.1 g de garbanzo en 100 g de producto de semilla oleaginosa).

5 i) Producción del antisuero. Harina fina de garbanzo (100 mg en 1 ml de agua dest) se emulsionó con 1 ml de adyuvante de Freund y se usó para inmunizar ovejas tres veces en intervalos de seis semanas. Seis semanas después de la última inmunización, el suero bruto se recogió y los anticuerpos se aislaron como en el Ejemplo 1 y se purificó mediante cromatografía en una columna. La fracción con el mayor contenido de IgG se determinó fotométricamente, los anticuerpos purificados por afinidad se dializaron con PBS y la solución se ajustó a una concentración de proteína de 1 mg/ml.

15 (ii) Acoplamiento de los anticuerpos contra garbanzo con digoxigenina y biotina. Una porción de los anticuerpos anti-garbanzo purificados se marcó con digoxigenina y una porción con biotina. La digoxigenación y la biotilación se llevaron a cabo como se muestra en el Ejemplo 1, con los kits de marcado de digoxigenina y biotina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim (Kit de marcado de proteínas – DIG, Núm. Cat. 11 367 200 001; Kit de marcado de proteínas – biotina, Núm. Cat. 11 418 165 001 ). Entonces, los anticuerpos digoxigenados y biotilados se ajustaron a 1 mg/ml de PBS, azida de sodio al 0.2% y se congelaron.

20 (iii) Tiras de prueba de capa fina para la inmunocromatografía. Se utilizaron tiras de prueba anti-biotina/anti-digoxigenina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim.

25 (iii) Prueba de los anticuerpos anti-garbanzo biotilados y digoxigenados en tiras de prueba rápida estándar de biotina-antidigoxigenina. Diferentes pastas de avellana (cada una 0.5 g), con y sin garbanzos, se homogeneizaron cada una en 40 ml de PBS cada 10 minutos a 60°C, se extrajeron y se retiraron los componentes sólidos mediante centrifugación. Por cada uno, se transfirieron 400 µL de sobrenadante a un recipiente de reacción y se añadieron 5 µl, cada uno, de anticuerpo anti-garbanzo biotilado y digoxigenado. La muestra se dejó durante 10 minutos para la formación del complejo de sándwich. Posteriormente, se pusieron tiras de prueba rápida en la solución y el resultado se leyó después de 4 minutos. La sensibilidad fue inferior a 0.1 g de garbanzo por 100 g de muestra (0.1%).

35 (iv) Calibración de los estándares internos al límite de detección requerido (0.1 g garbanzo/100 g). Se probaron diferentes pastas de avellana y se produjeron estándares de garbanzo que correspondieron a 0.1 g de garbanzo por 100 g de muestra y se adaptó a la extracción de muestra sugerida, en el recipiente de control, aproximadamente 1 µg de garbanzo absoluto (correspondiente a 0.1 g de garbanzo por 100 g de pasta avellana) se diluyó en 5 µL de PBS, se añadieron 45 µl de trehalosa acuosa 100 mMol/L, se mezclaron las soluciones y se congelaron por choque a -60°C, y finalmente se secaron sobre la pared de la base del recipiente de control como una capa vítrea mediante calentamiento a 40°C.

40 Entonces, tanto en los recipientes de muestra como en los recipientes de control, se secaron 5 µl de anticuerpos biotilados o digoxigenados mezclados con 22,5 µL de trehalosa 100 mmol/L sobre las paredes laterales y en la tapa en otra capa vítrea mediante congelación de choque a -60°C y calentamiento a 40°C. Con el fin de hacer también visible la formación del complejo de detección, se secó una mínima cantidad de complejo de polivinilpirrolidona-yodo soluble en agua sobre la superficie inferior de la tapa y una mezcla de trehalosa/amilosa sobre la pared lateral del recipiente.

50 (v) Inmunocromatografía. Se añadieron 400 µl de extracto de pasta de avellana a la muestra preparada y a los recipientes de control, que se cerraron e invirtieron varias veces, con el fin de disolver los dos anticuerpos y el estándar de las paredes. Durante la inversión de los recipientes se formó simultáneamente un compuesto de inclusión yodo-amilosa azul. Después de un tiempo de reacción de 10 minutos, se abrieron los recipientes de reacción y se colocó una tira de prueba en cada uno de los recipiente de muestra y de control con el estándar, y después de 4 minutos, se leyeron las tiras de prueba según la Tabla 2.

### **Ejemplo 3** Determinación de toxina A de *Clostridium difficile* en muestras de heces

55 Las infecciones por *Clostridium* son un gran peligro. El diagnóstico rápido requiere detección directa en heces.

60 Por lo tanto, se desarrolló una tira de prueba para la detección de toxina A de *Clostridium difficile* en heces. El desarrollo comprendió las etapas (i) purificación de un antisuero comercial (anticuerpo en línea, cabra policlonal, 1 mg, AB1N113066) usando cromatografía de afinidad en una columna de proteína G; (ii) acoplamiento de los anticuerpos a biotina o digoxigenina; (iii) prueba de los anticuerpos marcados utilizando tiras de prueba estándar de biotina-digoxigenina con diferentes muestras de heces; (iv) adaptación del estándar sobre la pared a la necesaria sensibilidad de detección de las tiras de prueba.

65 (i) Purificación del antisuero. El antisuero comercial se purificó en una columna de Nab (columna

y método de Pierce, Rockford, IL 61105, EE.UU., Cat. Núm. 1940.1, "protocolo de purificación por flujo de gravedad") y la fracción de IgG se aisló como en los ejemplos anteriores. Los anticuerpos purificados por afinidad se dializaron con PBS y se ajustaron a 1 mg/ml.

5 (ii) Acoplamiento de los anticuerpos de toxina A de *C. difficile* a digoxigenina y biotina. Una porción de los anticuerpos anti-toxina A de *C. difficile* se acopló a digoxigenina y una porción a biotina. La digoxigenación y la biotilación se llevaron a cabo como en los Ejemplos 1 y 2.

10 (iii) Tiras de prueba de capas fina para inmunocromatografía. Se utilizaron tiras de prueba rápida anti-biotina/anti-digoxigenina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim.

(iii) Prueba de los anticuerpos anti-toxina A de *C. difficile* biotilados y digoxigenados, en las tiras de prueba estándar de biotina-digoxigenina. Se dispersaron muestras de heces (cada una 0.2 g), con y sin toxina A de *C. difficile*, en 40 mL de PBS cada una durante 10 minutos a 60°C, se extrajeron, y después se eliminaron todos los constituyentes sólidos mediante centrifugación. Por cada uno, se transfirieron 400 µL de sobrenadante en un recipiente de reacción y se añadieron 5 µl, cada uno, de anticuerpo anti-toxina A de *C. difficile* biotilado y digoxigenado. La muestra se dejó durante 10 minutos para la formación del complejo de detección. Después, se pusieron tiras de prueba rápida en la solución y se leyeron los resultados después de 4 minutos.

20 (iv) Adaptación y calibración del estándar al límite de detección requerido (1 a 5 µg de toxina A de *C. difficile*/g de heces). Se probaron diferentes muestras de heces y se produjeron estándares de toxina A de *C. difficile*. En la adaptación a la extracción de muestra sugerida, esta sensibilidad requerida correspondió a una cantidad de 4 a 20 ng de toxina A absoluta de *C. difficile* en el recipiente de control. Se diluyó esta cantidad (4 a 20 ng de toxina A de *C. difficile*) en 5 µl de PBS, se añadieron 45 µl de trehalosa acuosa 100 mMol/L, se mezclaron las soluciones y se congelaron por choque a -60°C, y finalmente se secaron sobre la pared de la base del recipiente de control como una capa vítrea mediante calentamiento a 40°C.

30 Entonces, tanto en los recipientes de muestra como en los recipientes de control, se secaron 5 µl de anticuerpos biotilados o digoxigenados mezclados con 22.5 µl de trehalosa 100 mmol/L sobre las paredes y la tapa en una capa vítrea adicional mediante congelación a -60°C y calentamiento a 40°C como capas vítreas adicionales.

35 (v) Inmunocromatografía. Se añadieron 400 µl de extracto de heces a la muestra preparada y los recipientes de control, y se disolvieron los anticuerpos en la pared y en la tapa (con y sin estándar) en los mismos, de manera que pudiera formarse el complejo de detección para la detección en cromatografía de capa fina. Después de un tiempo de reacción de 10 minutos, se colocaron tiras de prueba en los recipientes de muestra y de control. La presencia del complejo de detección se leyó según la Tabla 2.

40 (vi) Determinación de seguimiento y muestra ciega negativa y positiva: Debido a la reacción paralela de la muestra en el recipiente de control, se dispuso de una banda de referencia que pudo ser comparada directamente con la banda de la tira de prueba. Por lo tanto, siempre fue posible una interpretación del resultado. Además, en caso de duda, se pudo realizar una comparación con las bandas en una prueba ciega negativa y positiva. Las pruebas ciegas negativas y positivas con 1 x PBS, en lugar de extracto de heces, pueden realizarse después de un cierto periodo de tiempo como resultado de la estandarización de los recipientes de muestra y de las tiras de prueba cromatográfica, lo cual es una ventaja considerable (véase Fig. 3a y 3b). Fig. 3a muestra la comparación de una prueba ciega positiva y una negativa, en la que la prueba ciega positiva (tira a la derecha) comprende analito según el límite de detección requerido (4 ng de toxina de *C. difficile*). Fig. 3b muestra comparaciones de una muestra negativa de heces y una prueba ciega negativa (par de comparación a la izquierda) y una muestra positiva con una muestra positiva impregnada (par de comparación a la derecha).

50 En la muestra positiva impregnada no se visualizó banda adicional, aparte de la banda de control y la banda de detección, lo que representa una identificación de la banda de detección. A través de esas comparaciones o determinaciones de seguimiento, se pueden reconocer fácilmente bandas cromatográficas fantasma o de sombra y permiten una evaluación cuantitativa de los resultados.

55 Por lo tanto, siempre hubo bandas comparativas disponibles, a saber (i) de una prueba ciega negativa (sin analito en PBS). La prueba ciega negativa asegura que la sustancia no se detecta cuando no está presente. En la prueba ciega negativa, sólo los reactivos del proceso de detección se someten a la prueba, sin añadirlos a la sustancia a analizar. En este caso, la reacción tiene que ser negativa. Si la reacción sucede de todos modos, los reactivos están contaminados e inutilizables para esta determinación, o hay un error sistemático del proceso; (ii) de una prueba ciega positiva (analito en PBS). La prueba ciega positiva asegura que la sustancia buscada se detecta si está presente. La prueba ciega doble, es decir, la combinación de la prueba ciega positiva y negativa, asegura la fiabilidad del proceso utilizado, (iii) a partir de una muestra real para la comparación; y (iv) a partir de la llamada prueba real impregnada, en la que debe producirse la reacción de detección. Si la reacción de detección no

se produce, la prueba no es fiable, ya sea porque los reactivos están envejecidos o porque la mezcla a analizar (extracto de muestra de heces) comprende componentes que inhiben la reacción de detección. Dado que las muestras de heces pueden ser muy diferentes, siempre se debe considerar un peligro de este tipo, en particular, para las muestras de heces.

La combinación de tiras de prueba cromatográfica para complejos hapteno-antihapteno con recipientes de prueba adaptados que comprenden reactivos, como pruebas ciegas positivas y negativas, para la formación del complejo hapteno-antihapteno en una cantidad determinada por el límite de detección requerido, permite la puesta a disposición de un conjunto de pruebas directamente idóneo para la detección de ingredientes y gérmenes en los productos alimenticios y forrajes según los requisitos legales. Este kit de prueba también permite probar muestras muy heterogéneas de consistencia variable, y en particular de muestras de heces en diagnóstico.

**Ejemplo 4** *Kit de prueba para la determinación biomolecular de Salmonella en alimentos, forrajes, muestras veterinarias y otros productos utilizando hibridación de sonda y determinación de punto final en una tira de prueba rápida*

Las contaminaciones por Salmonella en los alimentos ocurren a nivel mundial y son la causa más común de diarrea. Convencionalmente, la determinación de la presencia o ausencia de Salmonella se lleva a cabo mediante pre-enriquecimiento y cultivo selectivo en placas específicas y normalmente lleva de 3 a 5 días. Existe una gran necesidad de métodos de prueba más rápidos y fiables.

Se desarrolló una prueba rápida fiable para la determinación biomolecular de Salmonella en alimentos usando hibridación de sonda. El desarrollo comprendió las fases de (i) identificación de los cebadores y la sonda; marcado de un cebador con biotina y de la sonda con digoxigenina; (ii) prueba del producto de PCR con tiras de prueba rápida estándar de biotina-digoxigenina con estándares de ADN y diversas muestras; (iii) adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, de la sonda marcada y tampón de amplificación concentrado dos veces (mezcla maestra); (iv) adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, de la sonda marcada, de ADN de referencia de Salmonella y de un tampón de amplificación doble concentrado sobre la pared de un recipiente de reacción de PCR de 0.2 ml para la reacción de control.

(i) Identificación de los cebadores y sonda: se seleccionó el gen InvA con los siguientes cebadores y sonda para la determinación de Salmonella:

Sal287 (cebador):	5' - gTgAAATTATCgCCACgTTCgggcAA (26-mero),
Sal571_Biotina (cebador):	5' - BIO - TCATCgCACCGTCAAaggAACC (22-mero),
Sal invA DIG (sonda):	5' - DIG - CTCTggATggTATgCCCggTA (21-mero).

(ii) Prueba del producto de PCR con tiras de prueba rápida estándar de biotina-digoxigenina con estándares de ADN y varias muestras, y adaptación y secado de los oligonucleótidos marcados sobre la pared del recipiente: Se usaron tiras de prueba rápida anti-biotina/anti-digoxigenina Roche Diagnostik GmbH, Mannheim. En estas tiras de prueba rápida, se aplicó el amplificado PCR-digoxigenina con anticuerpos anti-digoxigenina marcados con oro en la zona de aplicación impregnada de la prueba de tira rápida. El producto de PCR teñido pudo detectarse entonces en la CCF por su unión a estreptavidina. Se utilizó el siguiente método:

a) Enriquecimiento de las muestras de alimentos

Se pre-enriquecieron 25 g de muestra (por ejemplo, pollo u otros alimentos, forraje, etc.) en 225 ml de agua de peptona tamponada (por ejemplo Oxoid) y se incubaron durante 18 a 22 h a 37°C. Se llevó a cabo enriquecimiento selectivo en caldo de peptona de soja Rappaport-Vassiliadis (RVS, CM0866, Oxoid Limited, Basingstoke, UK) usando 0.1 mL de la muestra pre-enriquecida en 10 mL de solución RVS durante 4 a 6 horas a 42°C.

Lisis térmica (liberación del ADN de Salmonella): 1 ml del producto de enriquecimiento se transfirió a un recipiente de reacción de 2 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante se retiró y el sedimento que se había formado se introdujo en 200 µl de tampón EDTA 0.1 X, se agitó en vórtex y se lisó durante 10 minutos a 95°C. Después de enfriar durante 1 a 2 minutos a 4°C, la muestra se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se disolvió de nuevo 1:10 en solución tampón EDTA 0.1 X.

b) PCR e hibridación

5	284 pb	<b>programa del ciclador:</b>	<b>95°C</b>	<b>10 min</b>	<b>30 ciclos</b>
			<b>95°C</b>	<b>15 seg</b>	
			<b>67°C</b>	<b>60 seg</b>	
	Fase de hibridación		<b>95°C</b>	<b>1 min</b>	
			<b>30 °C</b>	<b>1 min</b>	

10	tampón de amplificación 2 x (por ejemplo Taq)		1x	
			12,5 µL	
	Sal287	<b>10µM</b>	0.5 µL	<b>200 nM</b>
	Sal571 Biotina	<b>10µM</b>	0.5 µL	<b>200 nM</b>
	Sal invA DIG k	<b>10µM</b>	0.5 µL	<b>200 nM</b>
	agua		6 µL	
15		total	20 µL	
	muestra / ADN estándar		5 µL	
	total en tubo PCR:		25 µL	

20 Después de la PCR, se abrieron los tubos de PCR y se pipetearon directamente 150 µl de solución salina tamponada fosfato (PBS) (con Tween-20 al 0.1%) y se mezclaron con el amplificado. Se sumergió una tira de prueba rápida en la mezcla y, después de 5 segundos, se añadieron 150 µl adicionales de tampón PBS (con Tween-20 al 0.1%). El resultado pudo leerse después de 1 a 2 minutos.

25 (iii) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, la sonda marcada y tampón de amplificación doble concentrado. A continuación, se secaron 0.5 µl de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso y 0.5 µl de sonda marcada con digoxigenina (cada vez, disueltos en 10 µl de trehalosa 20 mmol/L) sobre la pared lateral de recipiente de reacción de PCR de 0.2 ml a 40°C durante 4 horas. En principio, el tampón de amplificación doble (Taq PCR MasterMix, QIAGEN, Hilden, DE, Núm. Cat. 201443) también pudo secarse en esta fase. Esto se haría mejor mediante liofilización, durante la cual la mezcla se congela primero a -20°C y posteriormente se calienta suavemente a 10°C al vacío.

30 (iv) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, la sonda marcada, un ADN de referencia de Salmonella y un tampón de amplificación doble concentrado para la reacción de control: A continuación, se secaron 0.5 µl de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso, 5 µl de sonda marcada con digoxigenina y 5 pg de ADN de referencia de Salmonella (cada vez, en 10 µL de trehalosa 20 mmol/L) como una capa vítrea sobre la pared lateral de un recipiente de reacción de PCR de 0.2 ml (control) a 40°C durante 4 horas. En principio, el tampón de amplificación doble también pudo secarse en esta fase. Esto se llevaría a cabo mejor mediante liofilización, durante la cual la mezcla se congela primero a -20°C y luego se calienta suavemente a 10°C al vacío.

35 Se introdujeron 12.5 µL de muestra lisada o ADN extraído y 12.5 µL de tampón de amplificación doble (o si el tampón de amplificación ya se ha secado sobre la pared del recipiente, 25 µL de muestra lisada) en el recipiente de reacción de PCR, y la PCR y la detección en la tira de prueba rápida se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. El límite de detección fue una salmonela en 25 g de muestra. Fig. 4 muestra un resultado típico de la reacción. La tira de la izquierda representa una muestra negativa después de la reacción, y la tira de la derecha representa una muestra positivamente dopada (con 1 salmonela por muestra de 25 g) después de la reacción, o una reacción de control con ADN de referencia de Salmonella pre-secado en la recipiente de reacción.

50 **Ejemplo 5** *Kit de prueba para la determinación biomolecular de Campylobacter coli, lari y jejuni (Campylobacter a partir de ahora) en alimentos, forrajes, muestras veterinarias y otros productos usando hibridación de sonda y determinación de punto final en una tira de prueba rápida*

55 Las contaminaciones por Campylobacter en los alimentos ocurren a nivel mundial y son una de las causas más comunes de diarrea. Convencionalmente, la determinación de la presencia o ausencia de Campylobacter se lleva a cabo mediante enriquecimiento previo y cultivo selectivo en placas específicas y normalmente lleva de 3 a 5 días.

60 Se desarrollará una prueba rápida fiable para la determinación biomolecular de Campylobacter en alimentos utilizando hibridación de sonda. El desarrollo comprendió las fases del Ejemplo 4, con el ADN de referencia de Campylobacter usado en la fase (iv).

(i) Identificación de los cebadores y sonda: Se seleccionó un gen 16S-ARNr con los siguientes cebadores y sonda para la determinación de Campylobacter:

65

Cam 18-1 (cebador): 5' - TTCCTTAggTACCgTCAGAA (20-mero),  
 OT 1559-Bio (cebador): 5' - BIO - CTgCTTAACACAAgTTgAgT (20-mero),  
 Cam16S-DIG1 DIG (sonda): 5' - DIG - TATAgTCTCATCCTACACC (19-mero).

5 (ii) Prueba del producto de PCR con tiras de prueba rápida estándar de biotina- dioxigenina con estándares de ADN y varias muestras, y adaptación y secado de los oligonucleótidos marcados sobre la pared del recipiente: Se usaron tiras de prueba rápida anti- biotina/anti-digoxigenina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim. En estas tiras de prueba rápida, el amplificado de PCR-digoxigenina con anticuerpos anti-digoxigenina marcados con oro se aplicó en la zona de aplicación impregnada de la tira de prueba rápida. El producto de PCR teñido pudo entonces detectarse en la CCF por su unión a estreptavidina. Se utilizó el siguiente método:

10 a) Enriquecimiento de las muestras de alimentos

15 Se produjo una solución de enriquecimiento selectivo para *Campylobacter* según las instrucciones del proveedor con caldo nutriente Núm. 2 (Núm. de catálogo CM0067), suplemento de crecimiento para *Campylobacter* (líquido; SR0084). PRESTON suplemento Selectivo para *Campylobacter* (SR0117) y sangre de caballo lisada (SR0048: Oxoid Limited, Basingstoke, Reino Unido).

20 Se pesaron 25 g (ml) de una muestra de alimento en una bolsa Stomacher estéril, "Preston" (Oxoid Limited, Basingstoke, Reino Unido) y se incubaron durante 24 ha 42°C en condiciones microaerófilas.

25 Para el aislamiento del ADN, se tomó 1 ml de la incubación y se procesó con un kit de purificación QIAGEN Lambda (QIAGEN GmbH, Hilden, DE, Núm. Catálogo 12523).

b) PCR e hibridación

287 pb	programa del ciclador:	<b>95°C</b>	<b>10 min</b>	<b>45 ciclos</b>
		<b>95°C</b>	<b>15 seg</b>	
		<b>55°C</b>	<b>30 seg</b>	
		<b>72°C</b>	<b>30 seg</b>	
fase de hibridación		<b>95°C</b>	<b>1 min</b>	
		<b>30°C</b>	<b>1 min</b>	

	tampón de amplificación 2 x (por ejemplo Taq)	1X	12.5 µL	
	Cam 18-1	<b>10µM</b>	0.5 µL	<b>200nM</b>
	OT1559-Bio	<b>10µM</b>	0.5 µL	<b>200nM</b>
	Cam16S-DIG1	<b>10µM</b>	0.5 µL	<b>200nM</b>
	agua		6 µL	
		total	20 µL	
	muestra / ADN estándar		5 µL	
	total en tubo PCR:		25 µL	

45 Después de la PCR, se abrieron los tubos de PCR y se pipetearon directamente 150 µl de tampón PBS (con Tween-20 al 0.1%) y se mezclaron con el amplificado. Se sumergió una tira de prueba rápida en la mezcla y, después de 5 segundos, se añadieron 150 µl de tampón PBS (con Tween-20 al 0.1%). El resultado pudo leerse después de 1 a 2 minutos.

50 (iii) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, de la sonda marcada y del tampón de amplificación doble concentrado: A continuación, se secaron 0.5 µl de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso y 0.5 µl de sonda marcada con digoxigenina (cada vez disueltos en 10 µl de trehalosa 20 mmol/L) como una capa vítrea sobre la pared lateral de un recipiente de reacción PCR de 0.2 ml a 40°C durante 4 horas. En principio, el tampón de amplificación doble puede secarse también en esta fase. Esto se realiza mejor mediante liofilización, en la que la mezcla se congela inicialmente a -20°C y posteriormente se calienta suavemente a 10°C al vacío.

55 (iv) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, la sonda marcada, un ADN de referencia de *Campylobacter* y un tampón de amplificación doble concentrado para la reacción de control: A continuación, se secaron 0.5 µl de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso, 0.5 µl de sonda marcada con

digoxigenina y 5 pg de ADN de referencia de Campylobacter (cada vez, disueltos en 10 µl de trehalosa 20 mmol/L) como una capa vítrea sobre la pared lateral de un recipiente de reacción de PCR de 0.2 ml (control) a 40°C durante 4 se haría mejor mediante liofilización, durante la cual la mezcla se congela primero a -20°C y posteriormente se calienta suavemente a 10°C al vacío.

5 El análisis de la muestra se llevó a cabo como en el Ejemplo 4. El límite de detección fue una campylobacteria en 25 g de muestra. Fig. 4 muestra un resultado típico de la reacción.

10 **Ejemplo 6** *Kit de prueba para la determinación biomolecular de Enterobacter sakazakii en alimentos a base de leche para bebés usando hibridación de sonda y determinación de punto final en una tira de prueba rápida*

15 E. sakazakii se describió por primera vez en 1989 como la causa de meningitis neonatal rara pero grave, sepsis, o afecciones necróticas de la enterocolitis. El grupo de mayor riesgo para las infecciones por E. sakazakii son los recién nacidos y los niños, en particular los prematuros. La mortalidad de los niños con meningitis es extremadamente alta del 50 al 75%. En muchos casos, la comida para bebés de leche en polvo fue descrita como la fuente del patógeno.

20 Se desarrolló una prueba rápida fiable para la determinación biomolecular de E. sakazakii en alimentos para bebés usando hibridación de sonda. El desarrollo comprendió las fases del Ejemplo 4, con ADN de referencia de Enterobacter utilizado en la fase (iv).

(i) Identificación de los cebadores y sonda: Se seleccionó la transición de la rpsU al gen dnaG con los siguientes cebadores y sonda para la determinación de Enterobacter sakazakii:

25 Esak-F1 (cebador): 5'- gggATATTgTCCCTgAAACAg (22-mero),  
 Esak-R1 Bio (cebador): 5' - BIO - CgAgAATAAgCCgCgCATT (19-mero),  
 Esak-S1 DIG (sonda): 5' - DIG - gTAgTTgTAgAggCCgTg (18~mero).

30 (ii) Prueba del producto de PCR con tiras de prueba rápida estándar de biotina-digoxigenina con estándares de ADN y varias muestras, y adaptación y secado de los oligonucleótidos marcados sobre la pared del recipiente: Se usaron tiras de prueba rápida anti- biotina/anti-digoxigenina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim. En estas tiras de prueba rápida, se aplicó el amplificado de PCR-digoxigenina con anticuerpos anti-digoxigenina marcados con oro sobre la zona de aplicación impregnada de la tira de prueba rápida. El producto de PCR teñido pudo entonces detectarse en la CCF por su unión a la estreptavidina.

35 Se utilizó el siguiente método:

a) Enriquecimiento de las muestras de alimento.

40 Se pesó una muestra de alimento en una bolsa Stomacher estéril, se diluyó 1:10 (p/v) con agua desionizada estéril (precalentada a 45°C) e incubada durante la noche a 37°C (por ejemplo, 25 g de muestra + 225 ml de agua). Entonces, se añadieron 10 ml de esta preincubación a 90 ml de solución de incubación de enterobacteriáceas y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

45 Para el aislamiento de ADN, se tomó 1 ml de la incubación y se procesó con un kit de purificación QIAGEN Lambda (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania, Núm. Catálogo 12523).

b) PCR e hibridación

50

78 bp	<b>programa del ciclador:</b>	<b>95°C</b>	<b>10 min</b>	
		<b>95°C</b>	<b>15 seg</b>	<b>45 ciclos</b>
		<b>67°C</b>	<b>60 seg</b>	
fase de hibridación		<b>95°C</b>	<b>1 min</b>	
		<b>30 °C</b>	<b>1 min</b>	

55

60

			<b>1x</b>	
5	tampón de amplificación 2 x (por ejemplo Taq)		12.5 µL	
	Esak-F1	<b>10µM</b>	0.75 µL	<b>300 nM</b>
	Esak-R1 Bio	<b>10µM</b>	0.75 µL	<b>300 nM</b>
	Esak-S1 DIG	<b>10µM</b>	0.5 µL	<b>200 nM</b>
	Agua		5.5 µL	
		total	20 µL	
10	muestra / ADN estándar		5 µL	
	total en tubo PCR		25 µL	

Después de la PCR, se abrieron los tubos de PCR y se pipetearon directamente 150 µl de tampón PBS (con Tween-20 al 0.1%) y se mezclaron con el amplificado. Se sumergió una tira de prueba rápida en la mezcla y, después de 5 segundos, se añadieron 150 µl de tampón PBS (con Tween-20 al 0.1%). El resultado pudo leerse después de 1 a 2 minutos.

(iii) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, la sonda marcada y tampón de amplificación doble concentrado. A continuación, se secaron 0.5 µl de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso y 0.5 µl de sonda marcada con digoxigenina (cada vez, disueltos en 10 µl de trehalosa 20 mmol/L) como una capa vítrea sobre la pared lateral de un recipiente de reacción de PCR de 0.2 ml a 40°C durante 4 horas. En principio, el tampón de amplificación doble también pudo secarse en esta fase. Esto se haría mejor mediante liofilización, durante la cual la mezcla se congela primero a -20°C y luego se calienta suavemente a 10°C al vacío.

(iv) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, de la sonda marcada, de un ADN de referencia de Enterobacter y tampón de amplificación doble concentrado para la reacción de control: A continuación, se secaron 0.5 µl de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso, 0.5 µl de sonda marcada con digoxigenina y 5 pg de ADN de referencia de Enterobacter (cada vez, disueltos en 10 µl de trehalosa 20 mmol/L) como una capa vítrea sobre la pared lateral de un recipiente de reacción de PCR de 0.2 ml (control) a 40°C durante 4 horas.

En principio, el tampón de amplificación doble también pudo secarse en esta fase. Esto se haría mejor mediante liofilización, durante la cual la mezcla se congela primero a -20°C y posteriormente se calienta suavemente a 10°C al vacío.

El análisis de la muestra se llevó a cabo como en el Ejemplo 4. El límite de detección fue una enterobacteria en 25 g de muestra. Fig. 4 muestra un resultado típico de la reacción.

**Ejemplo 7** *Kit de prueba para la determinación biomolecular de Helicobacter pylori en muestras de heces usando hibridación de sonda y determinación de punto final en una tira de prueba rápida*

Helicobacter pylori, que vive en la mucosa gástrica humana, es responsable de una serie de enfermedades gastroduodenales, es decir, trastornos del tracto gastrointestinal.

Los patrones de la enfermedad comprenden gastritis crónica-atrónica y afecciones malignas, como el cáncer de estómago o el linfoma MALT. La determinación directa en heces se elige a menudo para el diagnóstico.

Se desarrolló una prueba rápida fiable para la determinación biomolecular de Helicobacter pylori usando hibridación de sonda. El desarrollo comprendió las fases del Ejemplo 4, con ADN de referencia de Helicobacter pylori usada en la fase (iv).

(i) Identificación de los cebadores y sonda: Se seleccionó el gen ureasa C con los siguientes cebadores y sonda para la determinación de Helicobacter pylori:

HPure-R (cebador): 5' - gAAATggAAgTgTgAgCCgAT (21-mero),  
 HPureS\_Biotin (cebador): 5' - BIO - gACATCACTATCAACgAAgCAA (23-mero), HPure-  
 TM-DIG (sonda): 5' - DIG - ggTCTgTegCCAACATTT (18-mero).

(ii) Prueba del producto de PCR con tiras de prueba rápida estándar de biotina-digoxigenina con estándares de ADN y varias muestras, y adaptación y secado de los oligonucleótidos marcados sobre la pared del recipiente: Se usaron tiras de prueba rápida anti-biotina/anti-digoxigenina de Roche Diagnostik GmbH, Mannheim. En estas tiras de prueba rápida, el amplificado de PCR-digoxigenina con anticuerpos anti-digoxigenina marcados con oro se aplicó en la zona de aplicación impregnada de la tira de prueba rápida. El producto de PCR teñido pudo entonces detectarse en la CCF por su unión a estreptavidina. Se utilizó el siguiente método:

a) Extracción a partir de muestras de heces

Para la extracción de ADN a partir de una muestra de heces se siguieron las instrucciones del proveedor de un kit QIAGEN QIAamp ADN heces (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania, Núm. Catálogo 51504).

5 b) PCR e hibridación

10	92 pb	<b>programa del ciclador:</b>	<b>95°C</b>	<b>10 min</b>	
			<b>95°C</b>	<b>15 seg</b>	<b>45 ciclos</b>
			<b>62°C</b>	<b>60 seg</b>	
15	fase de hibridación		<b>95°C</b>	<b>1 min</b>	
			<b>30°C</b>	<b>1 min</b>	

20	tampón de amplificación 2 x (por ejemplo Taq)		<b>1x</b>	
	HPure-R	<b>10µM</b>	12.5 µL	
	HPure-S-Biotin	<b>10µM</b>	0.25 µL	<b>100 nM</b>
	HPure-TM-DIG	<b>10µM</b>	0.25 µL	<b>100 nM</b>
	agua		6.75 µL	
25		total	20 µL	
	muestra / ADN estándar		5 µL	
	total en tubo PCR:		25 µL	

30 Después de la PCR, se abrieron los tubos de PCR y se pipetearon directamente 150 µl de tampón PBS (con Tween-20 al 0.1%) y se mezclaron con el amplificado. La tira de prueba rápida se sumergió en la mezcla y, después de 5 segundos, se añadieron 150 µl adicionales de tampón PBS (con Tween-20 al 0.1%). El resultado pudo leerse después de 1 a 2 minutos.

35 (iii) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, la sonda marcada y tampón de amplificación doble concentrado. A continuación, se secaron 0.5 µL de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso y 0,5 µl de sonda marcada con digoxigenina (cada vez, disueltos en 10 µl de trehalosa 20 mmol/L) como una capa vítrea sobre la pared lateral de un recipiente de reacción PCR de 0.2 ml a 40°C durante 4 horas. En principio, el tampón de amplificación doble pudo también secarse en esta fase. Esto se haría mejor mediante  
40 liofilización, durante la cual la mezcla se congela primero a -20°C y posteriormente se calienta suavemente a 10°C al vacío.

45 (iv) Adaptación y secado del cebador marcado y no marcado, la sonda marcada, un ADN de referencia de Helicobacter y un tampón de amplificación doble concentrado para la reacción de control: A continuación, se secaron 0.5 µl de cebador directo biotinilado, 0.5 µl de cebador inverso, 0.5 µl de sonda marcada con digoxigenina y 5 pg de ADN de referencia de Helicobacter (cada vez, disueltos en 10 µl de trehalosa 20 mmol/L) como una capa vítrea sobre la pared lateral de un recipiente de reacción de PCR de 0.2 ml a 40°C durante 4 horas. En principio, el tampón de amplificación doble pudo también secarse en esta etapa. Esto se llevaría a cabo mejor mediante liofilización, durante la cual la mezcla se congela primero a -20°C y posteriormente se  
50 calienta suavemente a 10°C al vacío.

El análisis de la muestra se llevó a cabo como en el Ejemplo 4. El límite de detección fue una helicobacteria en 25 g de muestra. Fig. 4 muestra un resultado típico de la reacción.

55

## REIVINDICACIONES

1. Kit de prueba basado en tiras de prueba cromatográfica para la detección de complejos hapteno-antihapteno, que comprende recipientes con primeros y segundos receptores acoplados a hapteno contra un analito para la formación de un complejo hapteno-antihapteno, un portador en forma de tira revestido con una fina capa de un material de separación cromatográfica, una zona de marcado impregnada con primeros anticuerpos o receptores móviles marcados con molécula de reporte contra un primer hapteno, una zona de detección, en la cual un receptor contra un segundo hapteno ha sido inmobilizado, y una zona de control, en la cual segundos receptores contra los primeros receptores o anticuerpos móviles marcados con molécula de reporte han sido inmobilizados, en el que un primer complejo hapteno-antihapteno se forma en la zona de marcado y un segundo complejo hapteno-antihapteno se forma en la zona de detección, caracterizado en que el kit de prueba comprende uno o más primeros recipientes y uno o más segundos recipientes para acoger y posicionar tiras de prueba, en el que al menos un primer recipiente comprende una cantidad conocida de un analito peptídico incrustado en una capa vítrea de trehalosa, que es secada sobre la pared interior del recipiente de control como una capa, de tal manera, que la capa se disuelve en la solución de muestra acuosa, y en el que los segundos recipientes no comprenden una cantidad conocida de analito sino receptores acoplados a hapteno incrustados en una capa vítrea de trehalosa en cantidades, en las que un complejo de detección se forma cuando la muestra de prueba comprende el analito peptídico y resulta visible durante análisis cromatográfico de la tira de prueba.
2. Kit de prueba según la reivindicación 1, en el que los primeros y segundos recipientes comprenden cantidades predeterminadas de receptores acoplados a hapteno contra el analito, los cuales se secan de tal manera, que se disuelven tras la adición de la muestra acuosa.
3. Kit de prueba según la reivindicación 2, en el que cantidades determinadas de al menos dos receptores acoplados a hapteno, y opcionalmente del analito, han sido, cada uno, incrustados en una capa vítrea de trehalosa y secados en diferentes lugares sobre la pared interior de los recipientes.
4. Kit de prueba según la reivindicación 2, en el que cantidades determinadas de al menos dos receptores acoplados a hapteno, y opcionalmente del analito, han sido, cada uno, incrustados en una capa vítrea de trehalosa y secados en capas separadas sobre la pared interior de los recipientes.
5. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que una cantidad conocida de analito o receptor ha sido aplicada en la pared del recipiente mediante secado sobre la pared del recipiente de una cantidad definida de una solución acuosa que comprende el receptor o el analito, cuya solución comprende 20 to 600 mMol/L de trehalosa, a través de congelación de choque y posterior sublimación del agua.
6. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la adición de receptores acoplados a hapteno contra el analito en el recipiente de muestra y/o control se lleva a cabo mediante secado de sus soluciones acuosas, que comprenden entre 20 y 600 mMol/L de trehalosa, sobre la pared interior de los recipientes de muestra y control a una temperatura entre temperatura ambiente y 45°C.
7. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los receptores se eligen entre anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, lectinas, proteínas de unión, ADN, ARN, o aptámeros acoplados a moléculas de reporte.
8. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las moléculas de reporte se eligen entre biotina, digoxigenina, digoxina, estreptavidina, avidina, HRP (peroxidasa de rábano picante), fosfatasa alcalina, paranitrofenol, Texas red, fluorocromos, fluoresceína, rodamina, cumarina, AMCA, TRITC FITC, Cy2, Cy3 and Cy5.
9. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 basado en un sistema hapteno-antihapteno, que comprende anticuerpos primarios acoplados a biotina o digoxigenina.
10. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las diferentes capas o esferas con receptores acoplados a molécula de reporte desecados además comprenden los componentes para una reacción de coloración acompañante en solución acuosa.
11. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende reactivos de extracción para la detección de alérgenos principales en alimentos y forrajes.
12. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende medios de extracción para la extracción de un analito de heces o frotis.
13. Proceso basado en tiras de prueba cromatográfica para la detección de un analito peptídico en una solución acuosa, que dispone recipientes con primeros y segundos receptores acoplados a hapteno contra un analito para la formación de un complejo hapteno-antihapteno, un portador en forma de tira revestido con una fina capa de un

5 material de separación cromatográfica, una zona de marcado impregnada con primeros anticuerpos o receptores  
móviles marcados con molécula de reporte contra un primer hapteno, una zona de detección, en la cual un receptor  
contra un segundo hapteno ha sido inmobilizado, y una zona de control, en la cual segundos receptores contra los  
primeros anticuerpos o receptores móviles marcados con molécula de reporte han sido inmobilizados, en el que un  
10 primer complejo hapteno-antihapteno se forma en la zona de marcado, y un segundo complejo hapteno-  
antihapteno se forma en la zona de detección, caracterizado por disponer al menos uno o más primeros  
recipientes y uno o más segundos recipientes adaptados para acoger tiras de prueba, en los que al menos un  
primer recipiente comprende una cantidad conocida de analito peptídico incrustado en una capa vítra de trehalosa,  
15 la cual ha sido secada sobre el interior de la pared del recipiente, y los segundos recipientes no comprenden  
analito sino cantidades predeterminadas de al menos dos receptores acoplados a hapteno contra el analito  
peptídico incrustados en capas vítreas de trehalosa, las cuales han sido secadas sobre la pared interior del  
recipiente; contactar el analito peptídico en solución acuosa con los receptores acoplados a hapteno contra el  
analito; producir condiciones para la formación de un complejo hapteno-antihapteno con el analito; y detectar el  
20 complejo hapteno-antihapteno en la solución de muestra a través de su marcado colorante y una cromatografía  
de capa fina usando tiras de prueba, mediante comparación de las bandas coloreadas en las zonas de  
detección de las tiras de prueba.

14. Proceso según la reivindicación 13, en el que se disponen terceros recipientes que contienen una solución  
acuosa sin muestra y bandas coloreadas para una prueba ciega negativa y una positiva.

20

**Fig. 1**

Tira de prueba para un complejo biotina-digoxigenina

A	B	C
++	--	+

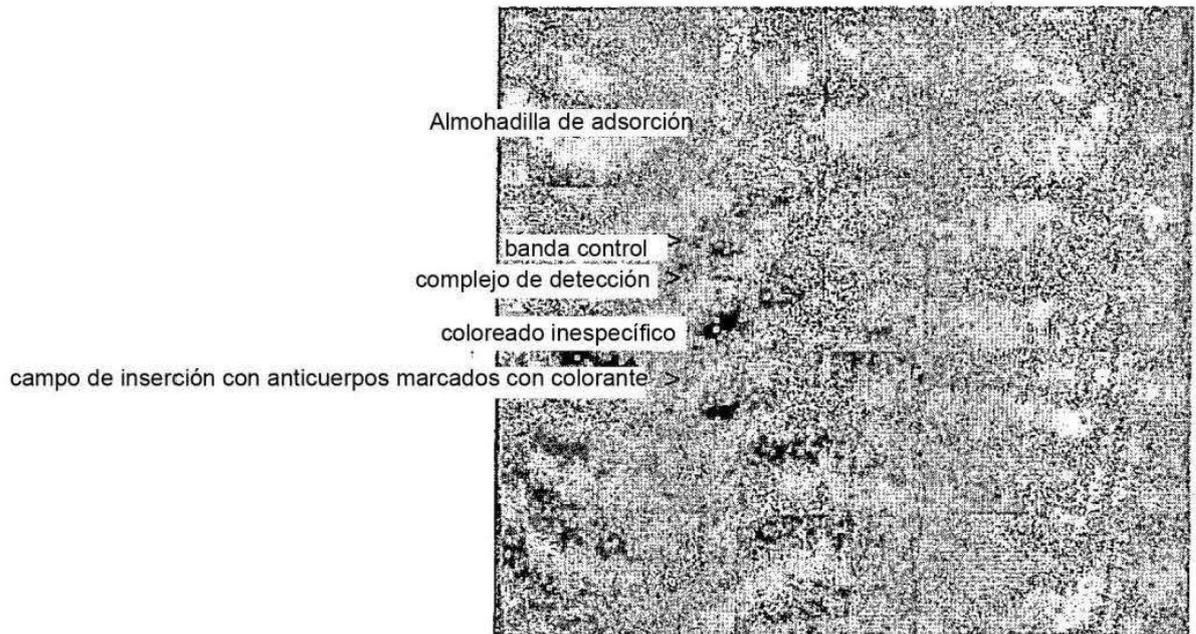
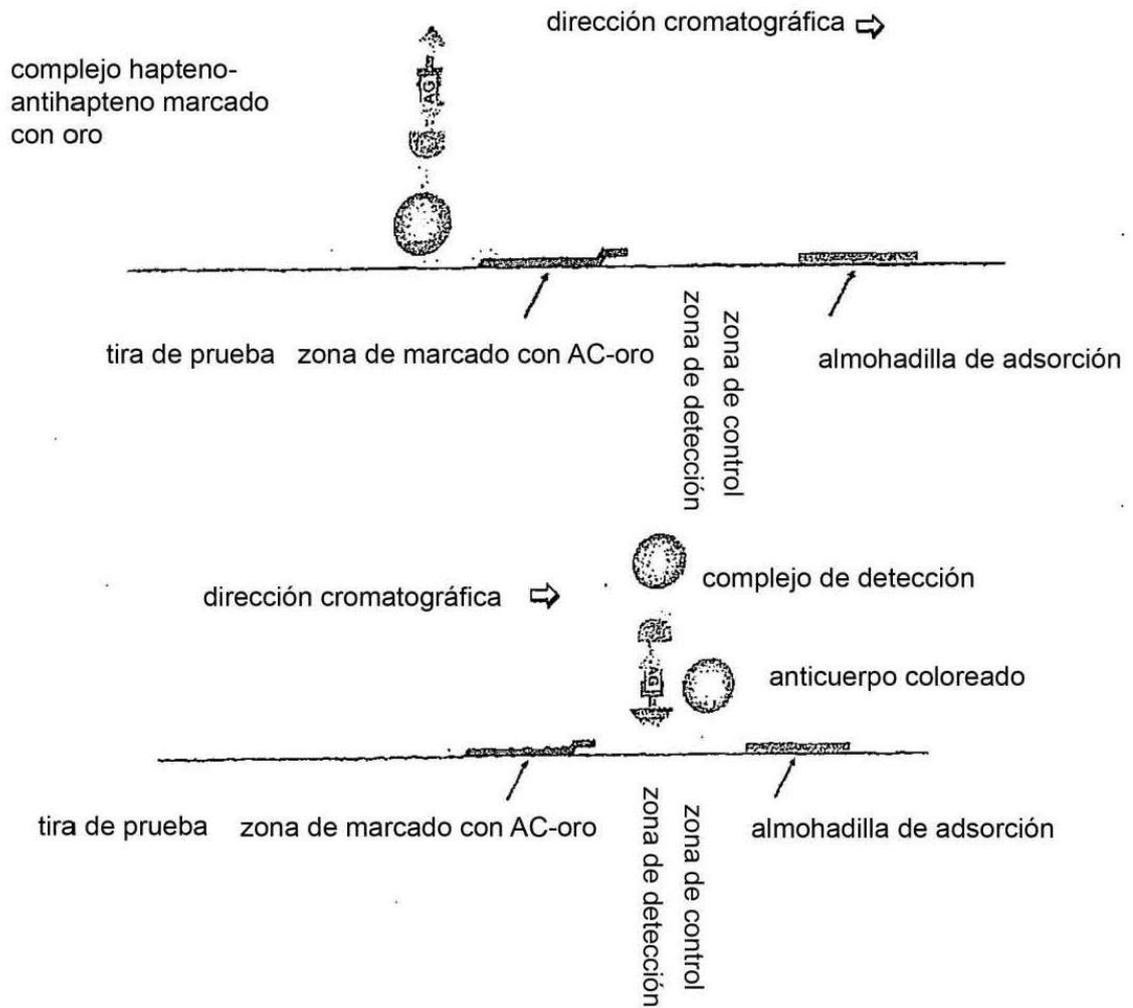
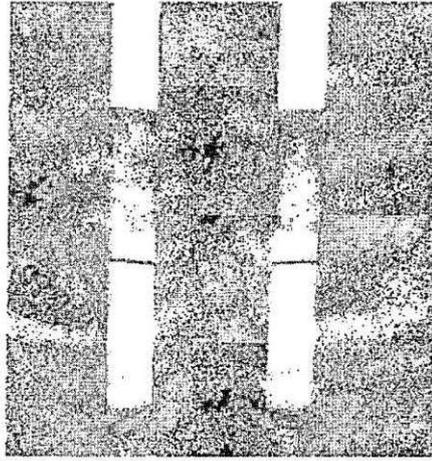


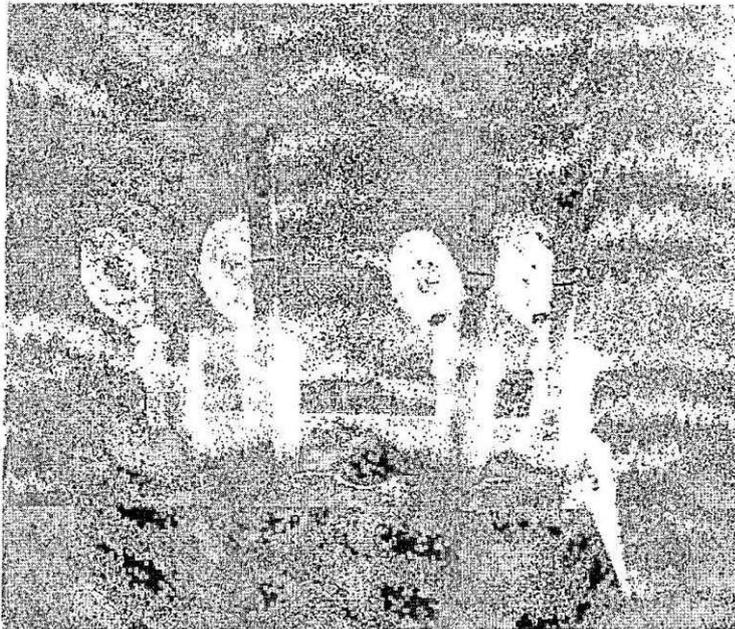
Fig. 2



**Fig 3a**



**Fig. 3b**



**Fig 4**

