

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 176**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2003** E 12181132 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** EP 2530466

54 Título: **Método y dispositivo para la detección de tricomonas**

30 Prioridad:

**30.03.2002 US 112410**

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

**12.12.2017**

73 Titular/es:

**XENOTOPE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)  
14785 Omicron Dr., Suite 103  
San Antonio, TX 78245, US**

72 Inventor/es:

**ALDERETE, JOHN P. y  
CASTELLA, PAUL C.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 646 176 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**

Método y dispositivo para la detección de tricomonas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método y kit de inmunoensayo de detección de la infección por Trichomonas.

5 Referencias

Alderete et al., Infect. Immun., 40:284-291, 1983

Alderete et al., Infect. Immun., 49:463-468, 1985.

Alderete et al., Infect. Immun., 52:70-75, 1986.

Alderete et al., Infect. Immun., 53:285-293, 1986.

10 Alderete et al., Infect. Immun., 53:697-699, 1986.

Alderete et al., Infect. Immun., 55:1037-1041, 1987.

Alderete and Garza, Infection and Immunity, 56(1):28-33, 1988.

Alderete and Garza, Infection and Immunity, 56(10):2256-2562, 1988.

Alonzo and Pepe, Statistics in Medicine, 18:2987-3000, 1999.

15 Arroyo et al., Molecular Microbiology, 6(7):853-862, 1992.

Arroyo et al., Arch Med Res 26(4):36-369, 1995.

Arroyo et al., Molecular Microbiology, 7(2):299-309, 1993.

Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059, 1970.

Lehker et al., Journal of Exp. Med., 174:311-318, 1991.

20 van Der Schee C., et al. J. Clin Microbiol. 1999 Dec; 37 (12) 4127-30

Wasserheit, J. N., Sex. Trans. Dis., 19:61-77, 1992.

Yap et al., Genitouria. Med., 71:402-404, 1995.

Zhang et al., Ann. Epidemioil., 5:325-332, 1995.

Antecedentes de la invención

25 Las Trichomonads son parásitos protozoarios que infectan a humanos y animales. Hay más de 15 especies de Trichomonads. *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) es una especie de Trichomonad para los humanos y causa la condición tricomoniasis (o "tricomoniosis" o "trich") tanto en hombres como en mujeres. El parásito se transmite sexualmente y ahora es el agente de enfermedades de transmisión sexual (STD) no viral más común del mundo. Se estima que de 5 a 8 millones de mujeres contraen tricomoniasis anualmente en los Estados Unidos, y hasta un 25%  
30 de las mujeres sexualmente activas están infectadas en un momento dado.

En hombres, se estima que la tricomoniasis representa el 17% de la uretritis no gonocócica, non-clamidal. Los síntomas clínicos varían tremendamente entre las mujeres, abarcando desde el porte asintomático hasta la vaginitis franca; y la infección puede persistir indefinidamente. Los síntomas graves incluyen dolor abdominal con secreción maloliente acompañada de irritación e incomodidad similar a una infección vaginal por hongos. Los hombres tienden a tener más enfermedades asintomáticas que duran en promedio 4 meses, pero se han documentado manifestaciones de enfermedades como uretritis, prostatitis, balanopostitis y otras en hombres infectados.  
35

En humanos, la infección con Trichomonas tiene consecuencias graves para la salud. Trichomonas secreta proteinasas que degradan los anticuerpos vaginales, las capas de células protectoras y las células de respuesta inmune, aumentando así la susceptibilidad de las mujeres infectadas a otras enfermedades de transmisión sexual.  
40 Los estudios han demostrado que las mujeres en riesgo de VIH tienen un riesgo de infección de VIH de 2 a 10 veces

mayor si se infectan con *T. vaginalis*, y un hombre positivo tanto para VIH como para Trichomonas tiene 6 veces más VIH en el semen, aumentando así la probabilidad de infectar a un compañero (Wasserheit, 1992). Además, la infección por Trichomonas aumenta el riesgo de contraer cáncer cervical y puede afectar negativamente tanto la fertilidad como el embarazo (Yap et al., 1995; Zhang et al., 1995). Afortunadamente, si la infección por el parásito se diagnostica con éxito, el paciente puede ser tratado en la mayoría de los casos.

El diagnóstico actual de tricomoniasis descansa en la detección e identificación morfológica del organismo vivo extraído de la cavidad vaginal en las mujeres o la uretra en los hombres. La identificación se logra mediante el examen microscópico de una preparación de soporte húmedo salino para la visualización directa de organismos móviles. Aunque son muy específicos cuando son positivos, los montajes húmedos a menudo son negativos en pacientes asintomáticos o levemente sintomáticos y en mujeres que se han lavado dentro de las 24 horas previas. La sensibilidad o confiabilidad general de la microscopía de montaje húmedo es del 58% (Weise et al.), y puede ser tan baja como del 30%. También se puede intentar la microscopía de montaje húmedo a partir de muestras de orina después de la centrifugación para concentrar cualquier trichomonads en el sedimento, que se resuspende y examina. La microscopía de montaje húmedo es altamente ineficaz cuando se realiza en muestras de orina, con una sensibilidad tan baja como 7% (en comparación con cultivo al 40%) (van Der Schee C., et al. J. Clin Microbiol. 1999 Dec; 37 (12) 4127-30). Además, el método de detección mediante microscopía de montaje húmedo, que utiliza cualquiera de los tipos de muestra descritos, es subjetivo, tedioso y requiere mucho tiempo y requiere una persona capacitada.

Los cultivos de muestras urogenitales pueden aumentar el número de casos detectados. Desafortunadamente, el procedimiento requiere varios días para completarse (por lo general de 2 a 5 días) y se debe realizar en laboratorios especiales con personal capacitado. Adicionalmente, ambos métodos requieren que los parásitos en las muestras sean viables antes de que puedan ser detectados, lo que limita la idoneidad de ciertos tipos de muestra. Por ejemplo, se ha determinado que la orina no es un medio de muestra apropiado para el diagnóstico de Trichomonas basado en el cultivo, a pesar de ser más sensible que el montaje húmedo (Mohamed et al. Sex. Transmitted Infect., 2001. 77(1) 78-9). Se han realizado muchos intentos para mejorar el diagnóstico de Trichomonas a partir de la orina, así como otros tipos de muestras, mediante PCR. Aunque la PCR es potencialmente más sensible que el montaje húmedo o el cultivo (87% según la referencia anterior), hay una falta de consenso científico sobre qué secuencias de cebador son específicas de Trichomonas (la PCR no es un método de diagnóstico aprobado por la FDA). Adicionalmente, el problema de los falsos positivos tanto en muestras discrepantes como en muestras clínicas contaminadas afecta la aplicación de esta técnica. Las muestras altamente amplificadas pueden proporcionar un resultado positivo que no es indicativo de una infección real, sino que en su lugar representa rastros de una infección previa. Además, la PCR es un procedimiento altamente técnico con muchas manipulaciones y controles de procedimientos, requiere equipos costosos y no permite el diagnóstico en el punto de atención; todos los factores que mitigan su idoneidad como un método de diagnóstico práctico para Trichomonas.

Se ha descrito un método de detección de la infección por Trichomonas por lisis de los microorganismos en una muestra y la liberación de sus ácidos nucleicos. La presencia de Trichomonas se determina hibridando los ácidos nucleicos liberados con las sondas. El método implica una gran cantidad de manipulaciones y el uso de costosos equipos de detección, y es menos sensible que la microscopía de montaje húmedo.

La alta frecuencia de la infección por Trichomonas, junto con la probabilidad de un resultado adverso para los casos que no se tratan de manera expedita, deja en claro la necesidad de una prueba de diagnóstico rápida, sensible y precisa para la detección de la infección por Trichomonas y la capacidad de evaluar la efectividad de los tratamientos. La prueba de diagnóstico debe ser apropiada para su uso con una variedad de muestras sospechosas de contener Trichomonas, ya sea que la muestra no contenga organismos vivos, y en particular, debe permitir la detección en orina (para muestras de hombres y mujeres) y muestras de frotis vaginal. Además, el método debería proporcionar una alta fiabilidad, por ejemplo, un resultado positivo para las personas infectadas.

#### Resumen de la invención

En un aspecto, la invención incluye un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano que comprende:

a) aplicar una muestra del sujeto a una zona de aplicación de muestra en un primer extremo de una tira seca, por lo que la muestra se mueve por acción capilar a lo largo de la tira seca hacia un segundo extremo, pasando así primero por una zona de reacción que comprende un primer anticuerpo monoclonal marcado no inmovilizado específico contra un epítipo de la proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis* y luego pasa a través de una zona de detección que comprende un segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado específico contra un epítipo de adhesina de *Trichomonas vaginalis*, en condiciones donde se formará un complejo antígeno/anticuerpo si el sujeto está infectado con *Trichomonas vaginalis*,

en el que la muestra es una muestra de orina, un hisopo endocervical, un frotis vaginal o una prueba de Papanicolaou, y

en el que dichos primer y segundo anticuerpos monoclonales estaban presentes en la tira de prueba antes de la aplicación de la muestra, y

en el que dichos primer y segundo anticuerpos monoclonales son específicos para diferentes epítomos en la misma proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis*, y

5 en el que dicho primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma DM116, y

en el que dicho segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma C55; y

10 b) detectar la presencia de dicho complejo, por lo que la presencia de dicho complejo detecta la infección por *Trichomonas vaginalis* en dicho sujeto.

La presencia o ausencia del complejo es diagnóstico con una fiabilidad de al menos aproximadamente 80%, y por lo general mejor que 90%, donde la muestra clínica es un frotis vaginal, y con una fiabilidad superior al 40% cuando la muestra clínica es orina.

15 Las proteínas adhesina de ejemplo, para la detección de la infección por *T vaginalis* en humanos, son proteínas adhesina AP65, AP51, AP33, AP23 de *T vaginalis* y fragmentos inmunológicamente reactivos de las mismas. De acuerdo con la presente invención, el primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma DM116, y el segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma C55.

20 En un formato de ensayo preferido, la etapa de contacto incluye colocar la muestra en una zona de aplicación de muestra de una tira seca que tiene, en sentido ascendente a descendente, la región de aplicación de muestra, una zona de reacción que contiene el primer anticuerpo monoclonal marcado no-inmovilizado, y una zona de detección que contiene el segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado en el complejo. En operación, (i) la muestra migra en un sentido descendente de dicha tira desde la zona de aplicación de muestra hacia la zona de reacción, (ii) el analito de péptido de adhesina en la muestra reacciona con anticuerpo no inmovilizado en la zona de reacción para formar un complejo anticuerpo-péptido de adhesina marcado móvil, y (iii) el complejo migra hacia la zona de detección, (iv) dicho complejo reacciona con el anticuerpo inmovilizado en la zona de detección para formar un complejo marcado inmovilizado en la zona de detección, y (v) el anticuerpo marcado no movilizado no complejo migra en sentido descendente de la zona de detección. La etapa de detección incluye detectar la presencia o ausencia del complejo marcado inmovilizado en la zona de detección.

30 En otro formato de ensayo, la muestra obtenida es una prueba de Papanicolaou, y la muestra se fija (por ejemplo, usando etanol o metanol). La prueba de Papanicolaou puede ser una prueba de Papanicolaou tradicional o una prueba basada en líquido, ejemplificada por la prueba de Papanicolaou Thin-Prep producida por Cytec. La muestra se prepara en presencia de anticuerpo marcado que detecta la proteína adhesina que se ha sometido a las condiciones de desnaturalización del proceso de fijación. El método puede incluir tratar la Thin-Prep para eliminar los anticuerpos marcados no unidos.

35 En otro aspecto, la invención incluye un kit para la detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, que comprende una tira seca capaz de absorber un fluido aplicado a la misma por capilaridad dentro de la tira, teniendo dicha tira, en un sentido ascendente (en un primer extremo) a descendente (en un segundo extremo) y en el siguiente orden,

- 40 1) una zona de aplicación de muestra,  
2) una zona de reacción, y  
3) una zona de detección,

45 en el que dicha zona de reacción comprende un primer anticuerpo monoclonal marcado no inmovilizado específico contra un epítomo de una proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis*, eficaz para formar con él, un complejo anticuerpo/proteína adhesina móvil, y dicha zona de detección comprende un segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado específico contra un epítomo de una proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis* en dicho complejo,

en el que dichos primer y segundo anticuerpos monoclonales están presentes en la tira antes de la aplicación de la muestra, y

50 en el que dichos primer y segundo anticuerpos son específicos para diferentes epítomos en la misma proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis*, y

en el que dicho primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma DM116, y

en el que dicho segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma C55, y

5 en el que, después de la aplicación de una muestra de fluido corporal a la zona de aplicación de muestra en el primer extremo,

(i) la muestra migra en sentido descendente en la tira hacia la zona de reacción,

(ii) la proteína adhesina en la muestra reacciona con el primer anticuerpo monoclonal previamente presente en la zona de reacción para formar un complejo anticuerpo/proteína adhesina marcado móvil

10 (iii) el complejo anticuerpo/proteína adhesina marcado móvil migra hacia la zona de detección en el segundo extremo,

(iv) el complejo anticuerpo/proteína adhesina marcado móvil se une al segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado previamente presente en la zona de detección, inmovilizando así dicho complejo en la zona de detección.

15 Estos y otros objetos y características de la invención se entenderán más completamente cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la vista en planta superior de una tira de prueba en un kit de ensayo *Trichomonas* de acuerdo con la invención;

La figura 2 muestra la vista en alzado lateral de la tira de prueba de la figura 1.

20 La figura 3 es una vista en planta de un kit de ensayo de acuerdo con la invención.

La figura 4 es una vista lateral en sección del kit de la figura 3.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

25 Los términos a continuación tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario en la especificación.

El término "Trichomonas", como se usa en este documento, incluye, pero no se limita a, un parásito protozoo del Orden Trichomonadida, Género Ditrichomonas, Trichomonas, Tritrichomonas y Pentatrachomonas, que comprende múltiples especies que infectan tanto a humanos como a animales. "Trichomonas" se refiere a cualquier especie de *Trichomonas*, por ejemplo, *Tritrichomonas foetus* (también conocida como *Trichomonas foetus*, *Tt. fetus*), *Tt. enteris*,  
30 y *T. paviovi* que infecta al ganado, *Tt. suis*, *Tt. rotunda*, y *T. buttrei* que infecta a los cerdos, *Dt. ovis* que infecta a las ovejas, *Tt. equi*, y *T. equibuccalis* que infecta a los caballos, *T. anatis*, *Tt. eberthi*, *T. gallinae*, y *T. gallinarum*, que infectan a las aves, *Tt. caviae*, *Tt. muris*, *Tt. wroni*, *Tt. minuta*, y *T. microti* que infectan a los roedores, *T. canistomae* y *T. felistomae*, que infectan a perros y gatos, y *T. tenax*, *T. vaginalis*, *Pt. Hominis*, y *T. macacovaginae*, que infectan primates (incluidos los seres humanos) en muestras biológicas. En el caso de la enfermedad humana,  
35 "Trichomonas" se refiere, pero no se limita a, la especie *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*). "*Trichomonas vaginalis*" se refiere a cualquier cepa de *T vaginalis* capaz de infectar a los humanos.

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, incluye, pero no se limita a, un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente y reconocen un analito (antígeno o anticuerpo). "Anticuerpo" también incluye, pero no se limita a, un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente y reconocen la región de unión al antígeno específica (idiotipo) de anticuerpos producidos por el huésped en respuesta a la exposición al(los) antígeno(s) de Trichomonas. Los ejemplos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados y monocatenarios, y similares. Los fragmentos de inmunoglobulinas incluyen fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión, que incluye presentación en fagos. Véase, por ejemplo, Paul, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3rd Ed.,  
40 45 1993, Raven Press, New York, for antibody structure and terminology.

El término "epítopo" significa un determinante antigénico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítomos generalmente consisten en agrupamientos de moléculas en la superficie, tales como aminoácidos o

cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

5 Los términos "se une específicamente a" y "específicamente inmunorreactivo con" se refieren a una reacción de unión que es determinante de la presencia del analito diana en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. De este modo, en condiciones de ensayo designadas, las unidades  
 10 estructurales de unión específicas se unen preferentemente a un analito diana particular y no se unen en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de prueba. La unión específica a un analito diana bajo tales condiciones puede requerir una unidad estructural de unión que se selecciona por su especificidad para un analito diana particular. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con un antígeno particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente  
 15 inmunorreactivos con un analito. Véase Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Publications, New York, (1988) para una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoensayos que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica. Por lo general, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo a ruido y más por lo general más de 10 a 100 veces mayor que el fondo.

20 Una "proteína" se refiere a un biopolímero compuesto de aminoácidos o subunidades análogas de aminoácidos, por lo general algunos o todos los 20 L-aminoácidos comunes encontrados en proteínas biológicas, aunque "proteína" comúnmente se refiere a un polipéptido relativamente grande, por ejemplo, que contiene 100 o más aminoácidos, y "péptido" para polipéptidos más pequeños, los términos se usan indistintamente en este documento. Es decir, el término proteína se puede referir a un polipéptido más grande, así como a un péptido más pequeño, y viceversa.

Un "fragmento inmunológicamente reactivo" de una proteína se refiere a una porción de la proteína que es inmunológicamente reactiva con un socio de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que es inmunológicamente reactivo con la proteína misma.

25 "Especificidad", en lo que se refiere al método de ensayo de la invención, se refiere a la capacidad del ensayo para detectar específicamente la infección por *Trichomonas*.

"Fiabilidad", en lo que se refiere al método de ensayo de la invención, se refiere al porcentaje de una población que se detecta como un verdadero positivo. Por ejemplo, al menos 80% de fiabilidad significa que el ensayo detectará la infección por *Trichomonas* en al menos el 80% de los sujetos analizados que de hecho están infectados con *Trichomonas*, como se determina, por ejemplo, mediante una prueba confirmatoria tal como cultivo o PCR. El término también se usa indistintamente con "sensibilidad".

## II. El ensayo de la invención

35 La presente invención se basa en el descubrimiento en este documento de que la infección por *Trichomonas vaginalis* en humanos se puede detectar fácilmente con alta sensibilidad formando un complejo inmune entre una proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis* o un fragmento inmunorreactivo de la misma y un anticuerpo que es inmuno-específico contra esta proteína, y detectar el complejo. La infección por *Trichomonas vaginalis* se detecta por la presencia de proteína adhesina o fragmentos inmunológicos de la misma en una muestra corporal, por ejemplo, muestra de orina o frotis vaginal. El reactivo de ensayo es un anticuerpo anti-adhesina marcado capaz de formar un complejo detectable con la proteína adhesina presente en la muestra. Una ventaja importante de esta prueba es que  
 40 se ha encontrado que tales proteínas adhesina están presentes en cantidades detectables en los frotis vaginales, esto es, secreciones vaginales, raspados o frotis del tracto vaginal o cuello uterino, o canal cervical, o prueba de Papanicolaou, en prácticamente todas las mujeres infectadas con *Trichomonas vaginalis* que se han sometido a la prueba de infección por *Trichomonas vaginalis* mediante el presente ensayo. De forma similar, se ha encontrado proteína adhesina en cantidades detectables en orina en hombres y mujeres positivos para *Trichomonas vaginalis* que se han probado mediante el ensayo de la invención. De este modo, el ensayo es muy sensible y se puede llevar a cabo fácilmente en hombres, con una muestra de orina, así como en mujeres, con cualquiera una muestra de frotis vaginal o de cuello uterino o de orina.

50 El ensayo de la presente invención se basa en reacciones de unión inmunológicas. Para una revisión de los procedimientos generales de inmunoensayos, véase BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 7.sup.th Edition, D. Stites and A. Terr, ed., 1991. De acuerdo con la invención, el ensayo detecta la presencia de un inmunogen de *Trichomonas*, un epitopo de la proteína de adhesión de *Trichomonas vaginalis*. La presencia del inmunogen de *Trichomonas* en una muestra biológica es indicativo de la aparición de infección por *Trichomonas vaginalis*.

55 El ensayo de la invención es altamente específico y sensible. Como se indicó anteriormente, se ha demostrado que el ensayo de la invención específico para *T. vaginalis* tiene una sensibilidad superior a aproximadamente el 80%, y que el 21% de los pacientes negativos del montaje húmedo (28/131) son positivos para el ensayo con *T. vaginalis* (utilizan do un cultivo como prueba confirmatoria o de resolución). Este aumento del nivel de sensibilidad permite la

identificación de un 37% adicional de pacientes infectados con *Trichomonas* (103/75). La especificidad global del ensayo de la presente invención es aproximadamente 98%.

Al practicar el método, primero se obtiene una muestra de fluido corporal apropiada como en un frotis vaginal, esto es, secreciones vaginales, raspados o frotis del tracto vaginal o del cuello uterino, o canal cervical, o prueba de Papanicolaou, en mujeres, o una muestra de orina en mujeres u hombres.

Estas muestras se pueden usar frescas o almacenadas (congeladas, secas, refrigeradas, según corresponda) para su uso posterior. Las muestras se pueden usar en su forma nativa (orina), o procesadas, extraídas, solubilizadas o manipuladas. La *Trichomonas vaginalis* en estas muestras puede ser viable o muerta, de células enteras o alterada, procesadas o no procesadas.

El desarrollo de inmunoensayos para la detección de *Trichomonas* ha sido en gran parte infructuoso debido a la falta de antígeno estable dependiente de especies. El éxito de la presente invención se basa en parte en la estabilidad de la proteína adhesina en *Trichomonas*. *Trichomonas* ha exhibido una dramática heterogeneidad antigénica (Alderete et al., 1985b; 1986a, 1987a). Con el fin de establecer y mantener la infección, el parásito es capaz de resistir el entorno hostil del tracto urogenital y evadir los mecanismos de vigilancia inmunológica, tal como la resistencia a los anticuerpos líticos y el complemento del huésped. El parásito ha desarrollado la capacidad de experimentar cambios fenotípicos (Alderete et al., 1986; Alderete et al., 1985), una estrategia usada por muchos parásitos para evadir la detección. Se ha observado que los aislados tomados del mismo paciente en dos momentos diferentes pueden exhibir diferentes fenotipos (Alderete et al., 1987). También se ha observado que el parásito sufre cambios fenotípicos en respuesta a su entorno. Por ejemplo, el entorno in vivo aparentemente favorece o selecciona organismos *T. vaginalis* que carecen de la expresión de un inmunógeno de superficie particular (P270), pero tras el cultivo in vitro, los parásitos vuelven al fenotipo opuesto produciendo P270. En otro ejemplo, la proteína adhesina AP65 se expresa a bajos niveles en entornos de cultivo típicos, pero se expresa a niveles significativamente más altos en el hospedador, o en un entorno de tipo in vivo. De este modo, los anticuerpos producidos contra organismos cultivados en condiciones in vitro pueden no ser efectivos para unirse a *Trichomonas* contenidas en muestras in vivo. En base a su nivel de expresión por *Trichomonas* crecido en un entorno de cultivo típico, la proteína adhesina AP65 no se apreciaría fácilmente como un analito potencial para su uso en un ensayo de diagnóstico. Adicionalmente, el parásito es proteolítico, es decir, es capaz de secretar proteasas que degradan antígenos de superficie y anticuerpos. Como resultado de los mecanismos defensivos anteriores, no se conoce ningún inmunógeno estable en el entorno para el desarrollo de anticuerpos anti-*Trichomonas*.

Las proteínas adhesina *Trichomonas* son por lo general proteínas expresadas en superficie, y se han asociado con la citoadherencia del parásito a las células epiteliales que recubren el tracto urogenital del animal huésped (Alderete and Garza, 1988, Arroyo et al., 1992; Lehker et al., 1991). Además, las adhesinas son enzimas funcionalmente activas.

Las proteínas adhesina no son candidatas obvias para el uso de diagnóstico por expertos en el arte debido a que son enzimas metabólicas y al hecho de que no se expresan en entornos de cultivo típicos. Las enzimas metabólicas comparten papeles fundamentales en todos los organismos y, por lo tanto, están altamente conservadas y comparten homología con proteínas huésped ubicuas (tal como otras enzimas metabólicas). Los antígenos que comparten homología con proteínas comúnmente encontradas generalmente no son aptos para la producción de anticuerpos y su uso en pruebas de diagnóstico. Por lo general no son inmunorreactivos o tienen una probabilidad muy baja de provocar respuestas inmunes fuertes. De este modo, tales antígenos son menos propensos a inducir anticuerpos de respuesta a la infección suficientes para la detección, ni generan anticuerpos poli- y monoclonales apropiados para la detección del propio antígeno. También se ha informado que las adhesinas parecen ser inmunorresistentes, como se evidencia por la dificultad de generar antisuero de título alto y anticuerpos monoclonales (mAb) en animales de experimentación (Alderete and Garza, 1988; Arroyo et al., 1992, 1993; Lehker et al., 1991). Además, es probable que los anticuerpos dirigidos contra tales antígenos sufran una baja especificidad, debido a reacciones con proteínas similares del huésped y otros copatógenos. De hecho, la similitud (mimetismo) de las adhesinas con las proteínas del huésped puede ser la base de la capacidad de los patógenos para evadir la detección y el ataque inmune. Los inventores determinaron que ciertas proteínas adhesina están altamente expresadas en huéspedes animales y son inmunorreactivas en entornos de cultivos particulares in vivo especiales; la adhesina también se expresa en cantidad suficiente, lo que permite la elevación de anticuerpos. De este modo, la selección de las proteínas adhesina representa una nueva estrategia en la selección de antígenos para ensayos de diagnóstico basados en inmunología.

Las proteínas adhesina y sus secuencias de codificación para el parásito humano *T. vaginalis* se han descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,922,563. Cuatro familias de proteínas adhesina (AP65, APS1, AP33 y AP23) se identifican como las adhesinas que median específicamente la unión a los receptores de las células epiteliales vaginales. Las cuatro familias de adhesina de *T. vaginalis* se agrupan en función de sus pesos moleculares relativos ( $M_r$ ), AP65 (65-kDa), AP51 (51-kDa), AP33 (33-kDa) y AP23 (23-kDa). Al menos tres de las familias de adhesina incluyen miembros que tienen referencias distintivas de ácido nucleico que pueden estar estrechamente relacionadas. Por lo tanto, cada adhesina respectiva es un miembro de una familia de múltiples genes, y, como se usa en este documento, los términos AP65, AP51, AP33 y AP23 designarán a todos los miembros de las familias de

proteínas adhesina Mr. *T. vaginalis* correspondientes. Además, las adhesinas están presentes en el genoma de *T. vaginalis* en copias múltiples.

De acuerdo con la presente invención, la familia de la proteína adhesina AP65 se selecciona como el inmunógeno para el ensayo de diagnóstico. El gen para la proteína AP65 tiene aproximadamente 1.8 kb de longitud. La familia de proteínas adhesina AP65 incluye seis miembros conocidos, tres de los cuales tienen (AP65-1, AP65-2 y AP65-3), se han descrito en detalle, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,922,563 a Alderete. Cada uno de los miembros está codificado por un gen de AP65 distinto. Las secuencias N-terminales de AP65-1 y AP65-2 son muy similares, siendo 9 de 12 aminoácidos idénticos. Los diagramas de hidropatía (Kyte and Doolittle 1982) de AP65-1, AP65-2 y Ap65-3 son muy similares con solo algunas diferencias. Las proteínas adhesina AP65 son exclusivas de *T. vaginalis*. Se ha demostrado usando un ensayo de ligando realizado simultáneamente con un estudio de hibridación cruzada usando insertos de ADNc como sondas para *T. vaginalis*, *T. suis* (trichomonad porcina) y *Tt feto* (trichomonad bovino), que el suero producido a partir de adhesinas de *T. vaginalis* no muestra reactividad cruzada con las otras especies.

#### A. Formato del ensayo

Los ensayos pueden ser directos o competitivos. En un ensayo de unión competitiva, el analito diana, por ejemplo, una proteína adhesina de *T vaginalis*, compite con un análogo de analito marcado por sitios de unión específica en un agente de unión preferiblemente inmovilizado, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a la proteína adhesina, unidos a una superficie de sólidos apropiada, por ejemplo, superficies de nitrocelulosa, nilón, PVC o poliestireno. La concentración de analito marcado unido al reactivo de captura es inversamente proporcional a la cantidad de analito libre presente en la muestra, que se puede detectar cualitativamente en forma de solución o unida, o se puede cuantificar, por ejemplo, mediante la determinación espectrofotométrica de proteína adhesina marcada en solución.

Los ensayos directos son por lo general ensayos en sándwich, en los que el analito diana, por ejemplo, una proteína adhesina de *T vaginalis*, se une tanto a un agente de unión marcado, por ejemplo, anticuerpo marcado, y un anticuerpo de captura inmovilizado, formando un complejo de sándwich marcado inmovilizado que puede ser detectado. El formato exacto del ensayo generalmente depende de la sensibilidad o especificidad esperada para el ensayo. En algunos ensayos, particularmente para aquellos ensayos que emplean reactivos lábiles, se puede adicionar un reactivo de control para confirmar la efectividad del reactivo marcado o de captura.

En otro formato de ensayo de unión directa, utilizado particularmente para el análisis de Papanicolau, se trata una muestra de frotis cervical de un sujeto femenino para eliminar sustancias interferentes, y se deposita sobre un sólido donde los componentes del frotis, por ejemplo, adhesinas de *T vaginalis* proteína, se inmovilizan, por ejemplo, uniéndose a una superficie de portaobjetos de vidrio tratado. A continuación, se aplica al portaobjetos un agente de unión marcado, por ejemplo, un anticuerpo antiadhesina marcado con fluorescencia, se deja unir a dianas inmunes específicas, seguido de lavado para eliminar el anticuerpo no unido. La presencia de ausencia de analito en la muestra de frotis se puede determinar mediante examen microscópico de fluorescencia del portaobjetos. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,174,742 y 5,741,662, como ejemplos, describen métodos para recoger y tratar material de frotis vaginal, y para detectar el material teñido. Un formato apropiado para una prueba de Papanicolaou es la prueba de Papanicolaou Thin-Prep® suministrada por Cytyc.

La presente invención se refiere a un formato de ensayo directo, el kit de ensayo de tira seca, que se detalla en la Sección III a continuación. En este formato de ensayo, una tira de prueba porosa o fibrosa que permite el flujo capilar a través de ella incluye, en un sentido ascendente a descendente, una zona de aplicación de muestra, una zona de reacción y una zona de detección. La zona de aplicación de muestra puede ser simplemente un área en la tira en la que se va a adicionar la muestra. La zona de reacción contiene un reactivo marcado no inmovilizado capaz de unirse a la muestra de analito, por ejemplo, una proteína adhesina, para formar un complejo móvil marcado, es decir, un complejo capaz de migrar a través de la tira de prueba, por lo general por flujo capilar, en un sentido descendente hacia la zona de detección. El analito es una proteína adhesina, el reactivo marcado es un anticuerpo anti-adhesina marcado, como se detalla a continuación. Por lo general, el reactivo se adiciona a la tira en forma soluble, y se deja secar, de modo que, al humedecerse, con la aplicación de muestra a la tira, el reactivo seco puede entrar en la fase soluble y migrar a través del medio de tira. Los detalles se dan a continuación, incluido el ejemplo 3.

La zona de detección contiene un reactivo de captura inmovilizado capaz de unirse a la unidad estructural del analito del complejo móvil, para inmovilizar el complejo marcado en esta zona, mientras que el reactivo marcado, pero no complejo pasa por la zona con el medio de fluido de muestra móvil. El reactivo de unión inmovilizado se puede unir covalentemente a la matriz de la tira o unirse estrechamente mediante un enlace no covalente, por ejemplo, fuerzas electrostáticas o de dispersión. En cualquier caso, la inmovilización es suficiente para permitir que el reactivo de unión capture e inmovilice el complejo marcado, a medida que el fluido de muestra migra a través de la zona de detección. Cuando el analito es una proteína adhesina, el reactivo de unión inmovilizado es preferiblemente un anticuerpo antiadhesina capaz de unirse específicamente a un epítipo de adhesina es decir accesible en el analito en forma de complejo. Es decir, el anticuerpo marcado y el anticuerpo de captura inmovilizado preferiblemente reconocen epítopos separados y distintos en las proteínas adhesina. Cuando el analito es un anticuerpo anti-

Trichomonas humano, el agente de unión es preferiblemente un anticuerpo antihumano no humano que tiene inmunorreactividad general con anticuerpos humanos.

La tira puede incluir además una segunda zona de captura en la que el reactivo marcado no complejo puede ser capturado, para servir como control para confirmar que el reactivo marcado se está liberando de la zona de reacción para moverse a través de la tira, y que el reactivo marcado está siendo capturado por agentes de captura inmovilizados. Cuando el reactivo marcado es un anticuerpo antiadhesina marcado, el agente de captura de control es preferiblemente un anticuerpo que es inmunorreactivo con el anticuerpo marcado. De este modo, por ejemplo, si el anticuerpo marcado es un anticuerpo monoclonal de ratón, el reactivo de captura de control podría ser un anticuerpo de conejo antiratón.

El ensayo es específico para la detección de la proteína adhesina AP65 de *T. vaginalis*, la unidad estructural de unión en los reactivos marcados y de captura son anticuerpos generados contra AP65 de *T. vaginalis*, y anticuerpos o antígenos que son específicos para la región constante (no epítipo) del reactivo marcado se usa como reactivo de control.

Hay una amplia variedad de marcadores que se pueden usar con una unidad estructural de unión (anticuerpo o antígeno) para formar un reactivo marcado. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con la unidad estructural de unión, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las disposiciones de eliminación. Los marcadores de la presente invención pueden ser solubles o en partículas, metálicas, orgánicas, o inorgánicas, y pueden incluir marcadores espectrales tales como la proteína verde fluorescente, colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, biotina, avidina, y estreptavidina), compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, luciferina y luminol); y enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), marcadores colorimétricos espectrales tales como oro coloidal, o partículas de carbono, o perlas de vidrio o de plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directa o indirectamente a un componente de la unidad estructural de unión de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,863,875 y 4,373,932. Los marcadores no radiactivos a menudo se unen por medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la unidad estructural de unión. El ligando luego se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que es inherentemente detectable o está unida covalentemente a un sistema de señal tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. El marcador se puede unir a la unidad estructural de unión mediante un enlace químico. Los dominios enlazantes son por lo general secuencias de polipéptidos, tales como secuencias de poli-gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Los enlazantes preferidos a menudo son subsecuencias de aminoácidos flexibles. Tales enlazantes flexibles son conocidos para los expertos en el arte. Por ejemplo, el poli(etilenglicol) está disponible comercialmente (Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala.). La unidad estructural de detección también se puede conjugar directamente con el compuesto generador de señal, por ejemplo, junto con una enzima o fluoróforo.

La presencia de un marcador se puede detectar mediante inspección, o un detector que controla una combinación de sonda o sonda particular. Los detectores típicos incluyen espectrofotómetros, fototubos y fotodiodos, microscopios, contadores de centelleo, cámaras, películas y similares, así como combinaciones de los mismos. Los ejemplos de detectores apropiados están ampliamente disponibles a partir de una variedad de fuentes comerciales conocidas para los expertos en el arte.

Para los fines de la presente invención, los marcadores preferidos no son radiactivos y se detectan fácilmente sin el uso de instrumentos sofisticados. Preferiblemente, los marcadores producirán una señal visible que se puede distinguir inmediatamente después de la inspección visual, o mediante detección de fluorescencia. Los marcadores preferidos incluyen aquellas que se pueden observar como: 1) quimioluminiscencia (usando peroxidasa de rábano picante y/o fosfatasa alcalina con sustratos que producen fotones como productos de degradación); 2) cambio de color (oro coloidal, que produce un precipitado coloreado con el evento inmunorreactivo), y 3) fluorescencia (usando, por ejemplo, fluoresceína y otras etiquetas fluorescentes). En una realización preferida de la invención, se usa oro coloidal como marcador y el marcador se conjuga directamente con la unidad estructural de unión (el anticuerpo o antígeno). Cuando se utiliza oro como el marcado, la reacción del complejo reactivo-análito marcado con el reactivo de captura da como resultado la aparición de un depósito de color rojo. Como se apreciará por un experto en el arte, el color que aparece en la reacción del complejo con el reactivo de captura inmovilizado en la zona de captura dependerá del marcador utilizado.

En un formato de ensayo preferido de la invención, los reactivos de captura y de captura control se inmovilizan sobre un sustrato sólido. Hay una variedad de soportes sólidos conocidos en la técnica que son apropiados para uso con la presente invención. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser perlas, membranas (por ejemplo, nitrocelulosa), pozos de microtitulación (por ejemplo, PVC o poliestireno), cuerdas, plástico, tiras, o cualquier superficie sobre la que los anticuerpos se pueden depositar o inmovilizar. Además, se puede emplear una gran variedad de polímeros orgánicos e inorgánicos, tanto naturales como sintéticos, como material para la superficie sólida. Los polímeros

ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), rayón, nilón, poli (butirato de vinilo), difluoruro de polivinilideno (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa, y similares. Otros materiales que se pueden emplear incluyen papel, vidrios, cerámicas, metales, metaloides, materiales semiconductores, cementos o similares. Además, se pueden usar sustancias que forman geles, tales como proteínas (por ejemplo, gelatinas), lipopolisacáridos, silicatos, agarosa y poliacrilamidas. También son apropiados los polímeros que forman varias fases acuosas, tales como dextranos y polialquilenglicoles o surfactantes, tales como fosfolípidos o sales de alquilamonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono) y similares.

La manera de unir una amplia variedad de compuestos a diversas superficies es bien conocida y está ampliamente ilustrada en la bibliografía. Véase, por ejemplo, IMMOBILIZED ENZYMES, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York, 1978, and Cuatrecasas, 1970. Los reactivos de captura y control se pueden unir covalentemente o unirse de forma no covalente mediante enlaces no específicos. Si se desea la unión covalente entre un compuesto y la superficie, la superficie normalmente será polifuncional o podrá ser polifuncional. Los grupos funcionales que pueden estar presentes en la superficie y usarse para unir pueden incluir ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilénicos, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. Además del enlace covalente, se pueden usar diversos métodos para unir no covalentemente un componente de ensayo. La unión no covalente es por lo general la absorción no específica de un compuesto a la superficie. Por lo general, la superficie se bloquea con un segundo compuesto para evitar la unión inespecífica de los componentes de ensayo marcados.

En una realización preferida de la invención, los reactivos de captura y control se absorben inespecíficamente en una membrana de nitrocelulosa y se bloquean mediante una solución reguladora de bloqueo (BSA al 0.5%, sacarosa al 4% en PBS) como se describe en el ejemplo 3.

De acuerdo con la presente invención, el ensayo detecta un inmunógeno específico de *Trichomonas*, las proteínas adhesina AP65 de *T. vaginalis*. Las unidades estructurales de unión de los reactivos marcados y de captura son anticuerpos producidos contra o dirigidos sustancialmente contra epítomos del inmunógeno.

El ensayo incluye además un reactivo de control que puede ser ya sea un control interno o externo. Un control interno puede consistir en un anti-anticuerpo potencialmente obtenido de una especie que es diferente de la especie utilizada para elevar los anticuerpos del reactivo marcado y el reactivo de captura, es decir, si el reactivo marcado y el reactivo de captura se obtuvieron de conejo, entonces el anticuerpo depositado en la región de control puede ser IgG antiratón de cabra, IgG antiratón de oveja, IgG antiratón de cerdo y similares. La producción de tales anticuerpos se analiza a continuación. Un control externo puede consistir en antígenos derivados de *Trichomonas*, ya sea de purificación celular, extractos crudos o proteínas recombinantes a las que se unirán el reactivo marcado y el reactivo de captura.

Los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos de cadena simple y los fragmentos de anticuerpos también son útiles como unidades estructurales de unión. De este modo, el término "anticuerpo", como se usa en este documento, también incluye anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpos ya sea producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados de nuevo usando metodologías de ADN recombinante.

Los anticuerpos usados en el ensayo de la invención se pueden obtener mediante técnicas de desarrollo de anticuerpos convencionales. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, eds., ANTIBODIES; A LABORATORY MANUAL, ColdSpring Harbor Laboratory, ColdSpring, N.Y. El inoculante apropiado para preparar los anticuerpos incluye, pero no se limita a, la proteína nativa, una proteína recombinante, una preparación de membrana en bruto o una preparación en bruto del parásito. Los anticuerpos apropiados deben ser inmunorreactivos en condiciones de solución reguladora detergente acuoso e iónico y no iónico.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal se produce mediante el uso de una línea celular de hibridoma (por ejemplo, como se describe por Kohler and Milstein, Nature 256, 1975, p. 495, o la Patente de los Estados Unidos No. 4,707,442 de Alderete). Se pueden usar varias líneas de células de mieloma para la producción de híbridos de células fusionadas, que incluyen P3/X63-Ag 8, P3/NSI/1-Ag 4-1, Sp2/10-Ag14 y S194/5.XXO.BUT.1. En un procedimiento de fusión típico, los linfocitos del bazo de un animal inmunizado contra un antígeno elegido se fusionan con células de mieloma. Los hibridomas resultantes se dispersan luego en una serie de tubos de cultivo separados o pozos de placas de microtitulación para seleccionar cultivos que producen un anticuerpo deseado. Los cultivos positivos se diluyen adicionalmente para obtener colonias que surgen de una sola célula (clones). Los clones se criban nuevamente para la producción del anticuerpo deseado. Las células de hibridoma usadas para preparar un anticuerpo monoclonal pueden cultivarse in vitro o en la cavidad corporal de un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de sobrenadantes de células de hibridoma cultivadas o de ascitis usando procedimientos convencionales tales como filtración centrífuga, precipitación, cromatografía o una combinación de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos de unión se generan contra la proteína adhesina AP65 de *T. vaginalis* y se producen mediante las líneas celulares DM116 y C55. Estos y otros Mabs antiadhesina se depositan

en the Hybridoma Depository at the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Tex. Tales anticuerpos se pueden fabricar con alta probabilidad y predictibilidad, usando cualquiera de los dos métodos generales que se han descrito en las referencias citadas anteriormente.

5 En un primer método general, los animales, por ejemplo, los ratones se inyectan con células completas o proteínas de membrana de *T. vaginalis*. (véase, por ejemplo, Alderete, 1986). Las células productoras de anticuerpos de los ratones se immortalizan y los Mab producidos por las células inmortalizadas se criban en reactividad con *T vaginalis*, por ejemplo, en cultivo. A continuación, los Mab se criban para determinar su reactividad contra una o más proteínas adhesina. Para identificar dos Mabs que interactúen con diferentes epítopos de la misma proteína adhesina, la proteína se puede dividir en fragmentos superpuestos separados, por ejemplo, de 10-25 residuos de aminoácidos, y  
10 estos fragmentos además se criban para inmunorreactividad a los dos o más Mabs identificados como anteriores que son inmunorreactivos con los diferentes fragmentos de adhesina individuales. Alternativamente, se pueden emplear estudios de unión competitiva estándar para analizar pares de Mabs que se unen a diferentes epítopos de la misma proteína adhesina.

15 En otro método general, las proteínas adhesina o los fragmentos de proteína, preparados, por ejemplo, mediante expresión recombinante de secuencias de codificación de adhesina de *T vaginalis*, como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,922,563 citada anteriormente. La(s) proteína(s) adhesina aislada(s) o fragmento(s) de proteína se usan luego directamente como un inmunógeno, por ejemplo, en ratones, para producir líneas celulares de hibridoma. A continuación, los Mabs producidos por las líneas celulares se criban para anticuerpos inmunorreactivos contra la proteína adhesina. Uno de los métodos descritos anteriormente se puede  
20 emplear entonces para identificar dos o más Mabs que son inmunorreactivos con diferentes epítopos de la proteína adhesina.

Se han producido anticuerpos de adhesinas en múltiples ocasiones usando una diversidad de enfoques diferentes. Por ejemplo, las líneas celulares de hibridoma que secretan anticuerpos anti-AP65 se han generado a partir de inoculaciones de ratones contra cualesquiera organismos Trichomonas enteros, preparaciones de membrana de  
25 Trichomonas, AP65 nativa purificada, AP65 recombinante u organismos Trichomonas enteros fijados con p-glutaraldehído y formaldehído. Los adyuvantes utilizados incluyeron adyuvante de Freund, acrilamida (en el caso de la proteína purificada en gel) y la unidad estructural no AP65 de proteínas quiméricas fusionadas a AP65. Los rendimientos típicos de líneas celulares que producen anticuerpos inmunorreactivos son 5-10% de las líneas celulares totales generadas a partir de las fusiones de hibridomas, una tasa consistente con las velocidades típicas para la generación de otras líneas celulares de anticuerpos no adhesina.

La unidad estructural de unión de los reactivos marcados y de captura es la proteína adhesina AP65 de *T vaginalis* o un fragmento inmunológico de la misma. La proteína adhesina de Trichomonas puede ser una molécula o fragmentos enteros nativos, sintetizados químicamente o producidos de forma recombinante. En una realización, la proteína adhesina se prepara por medios recombinantes. El método de preparación de inmunógenos recombinantes que contienen al menos un epítipo inmunorreactivo también es conocido para los expertos en el arte; y ha sido  
35 descrito en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,876,985 y 5,922,563. En resumen, el inmunógeno recombinante se puede preparar usando un vector de expresión que contiene un gen o genes que codifican el antígeno. Los genes codificantes se pueden seleccionar de una biblioteca de expresión de ADNc de Trichomonad diana mediante el cribado de la biblioteca con un anticuerpo policlonal que se produce contra una preparación en bruto del antígeno de interés. Los insertos de ADNc de aquellos plásmidos de expresión que expresan el antígeno de interés luego se subclonan y secuencian. Los insertos que codifican antígenos que codifican los diferentes miembros de una familia de inmunógenos, o de varios inmunógenos no relacionados, se agrupan, y se clonan en un vector de expresión y se usan para transformar *E. coli* u otras células huésped apropiadas. Secuencias de codificación de ejemplo para diversas proteínas adhesina *T vaginalis* se dan en las Patentes de los Estados Unidos citadas anteriormente. Cuando el inmunógeno es la familia de proteínas adhesina AP65 de *T. vaginalis*, el antígeno recombinante se expresa a partir de un casete de seis genes de adhesina AP65 casi idénticos que tienen un epítipo conservado. El antígeno recombinante resultante está altamente conservado y es estable para el desarrollo de anticuerpos. Sin embargo, se entiende que se pueden incluir diferentes números de genes y fragmentos de genes en el casete de expresión para producir una mezcla de antígeno recombinante, y la selección de genes apropiados y  
45 fragmentos de genes está dentro del conocimiento de los expertos en el arte.

Para seleccionar fragmentos inmunológicos que tienen la inmunorreactividad deseada de la proteína adhesina original o nativa, la proteína se puede fragmentar, por ejemplo, mediante digestión proteolítica, y los fragmentos probados para unirse a anticuerpos contra la proteína nativa. Limitado El análisis de aminoácidos N-terminal o C-terminal limitados de los fragmentos unidos se pueden usar para identificar los fragmentos de unión de interés.  
55 Alternativamente, en una configuración de expresión recombinante, la secuencia de codificación de adhesina se puede fragmentar por medios convencionales para formar fragmentos capaces de codificar fragmentos de adhesina de entre aproximadamente 25-300 aminoácidos de longitud. El fragmento así codificado se puede analizar convencionalmente en un sistema de expresión estándar, por ejemplo, sistema de expresión gt10 o gt11, mediante selección contra a un anticuerpo anti-adhesina marcado.

60 III. Kit de ensayo de tira seca

5 El kit de la invención, referido anteriormente como un kit de ensayo de flujo lateral de tira seca, proporciona un ensayo de flujo lateral de "una etapa" para la detección de un analito de Trichomonas (proteínas adhesina) presente en una muestra biológica. Como se describió anteriormente, el kit generalmente incluye una matriz compuesta de un material que permite el flujo capilar de la solución de muestra a lo largo de una trayectoria de flujo. La matriz define una zona de aplicación de muestra, una zona de reacción, una zona de detección y, opcionalmente, una zona de captura de control.

10 La matriz del dispositivo de ensayo por lo general será un material poroso capaz de flujo lateral no absorbente. Por "flujo lateral no absorbente", se entiende un flujo de líquido en el que todos los componentes disueltos o dispersos del líquido se transportan a velocidades sustancialmente iguales y con un flujo relativamente intacto a través de la membrana, en oposición a la retención preferencial de uno o más componentes como ocurriría, por ejemplo, en materiales capaces de adsorber o embeber uno o más componentes.

15 Un material de matriz no absorbente típico es un papel de filtro de fibra de vidrio. Otras membranas no absorbentes tales como membrana microporosa de polisulfona, nitrocelulosa, membrana de acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, copolímeros de acetato de vinilo y cloruro de vinilo, poliamida, policarbonato, nilón, orlón, poliéster, poliéster, poliestireno y similares, o las mezclas también se pueden usar. La selección de material de matriz con las propiedades deseables del material y la velocidad de flujo generalmente está dentro del conocimiento de los expertos en el arte.

20 El tamaño y la forma de la matriz no son críticos y pueden variar. Generalmente, la matriz es rectangular y la trayectoria del flujo es axial. La matriz porosa generalmente está respaldada por un soporte sólido generalmente impermeable. La matriz también puede estar contenida dentro, o parcialmente dentro, de un alojamiento o recipiente, hecho por lo general de plástico o material resistente al agua similar.

25 Una zona absorbente generalmente se incluye en los dispositivos de la presente invención. La zona de absorción se encuentra descendente de la zona de captura. La zona absorbente es un medio para eliminar el exceso de muestra y el marcador no unido de la matriz del dispositivo, con el fin de mantener el flujo capilar deseado a lo largo de la trayectoria del flujo. Generalmente, la zona de absorción incluye un material absorbente tal como papel de filtro, un filtro de fibra de vidrio o similares.

30 Una muestra de fluido, por lo general un extraído endocervical o frotis vaginal, orina o suero o saliva se aplica a la matriz en la zona de recepción de muestra. A medida que la muestra preparada fluye a través de la zona de detección, el reactivo marcado se une al analito diana que forma un complejo de reactivo-analito marcado, si el analito está presente en la muestra. A medida que la muestra fluye hacia la zona de captura, los analitos diana marcados estarán unidos por las inmunoglobulinas inmovilizadas, reteniendo así el marcador en la zona de captura. A medida que la muestra fluye hacia la zona de control, el exceso de reactivo marcado transportado con el fluido de muestra se unirá al reactivo de control, reteniendo así el marcador no complejo en la zona de control.

35 La acumulación de marcadores visibles se puede evaluar visualmente o mediante dispositivos de detección óptica. La retención de marcadores en la zona de captura indica la presencia del analito diana en la muestra. La retención del marcador en la zona de control indica que el fluido suficiente tiene un flujo que pasa por las zonas marcadas y de captura y que el reactivo marcado no se desnaturaliza o degrada debido al almacenamiento, la composición de la solución reguladora y la composición de la muestra, etc., y el ensayo es válido.

40 Además, la intensidad visible de los marcadores acumulados se puede correlacionar con la concentración o el título (dilución) del analito en la muestra del paciente. La correlación entre la intensidad visible de los marcadores acumuladas y la concentración del analito se puede hacer mediante la comparación de la intensidad visible con un estándar de referencia. De este modo, los niveles de analito se pueden determinar mediante dispositivos de la presente invención.

45 Las figuras 1 y 2 muestran una tira 10 de prueba, que es una realización del dispositivo de la invención, útil para realizar el método de ensayo de la presente invención. La tira 10 de prueba incluye una matriz 12 porosa alargada soportada por un soporte 13 sólido y que tiene extremos ascendente y descendente 14, 15, respectivamente. Una almohadilla 16 de material poroso está dispuesta en una parte ascendente de la matriz 12. Esta almohadilla incluye una zona o región 17 de recepción de muestra o de carga de muestra sobre la que se aplica una muestra que contiene péptido de adhesina a la tira, y descendente de la zona de carga de la muestra, una región o zona 20 de reacción que contiene un anticuerpo antiadhesina marcado con informador, móvil.

50 Como se ve en la figura 2, la almohadilla 16 está unida a la superficie superior de la matriz 12, y se comunica con ella por flujo de fluido capilar. De este modo, el fluido de muestra aplicado a la almohadilla de aplicación de muestra fluye a la almohadilla 16, a través de la almohadilla 16 hacia la región de reacción. Aquí el fluido de muestra causa la liberación del anticuerpo móvil en solución, donde reacciona con adhesina de muestra, formando un complejo marcado con adhesina móvil que puede migrar a través de la almohadilla y hacia la matriz 12, por flujo capilar a través de la almohadilla y la matriz adyacente.

La matriz 12, a su vez incluye una zona 22 de detección, donde se ha depositado una tira de reactivo de captura y una zona 24 de control donde se ha depositado una tira de reactivo de control. En esta realización ilustrada, el reactivo de captura y el reactivo de control se depositan como tiras que cruzan el ancho de la matriz 12 alargada. Sin embargo, se entiende que los reactivos de captura y control se pueden depositar en cualquier formato apropiado.

- 5 La matriz 12 de recubrimiento en su extremo descendente es una almohadilla 28 absorbente. Una cubierta de cinta sobre la almohadilla 28 absorbente proporciona una superficie de agarre o mango para la tira de prueba. El propósito de la almohadilla 28 es servir como un depósito absorbente, para continuar extrayendo fluido de muestra de la zona de aplicación a través de las zonas de detección y control.

- 10 La matriz 12 está compuesta de un papel de filtro de fibra de vidrio que permite que una muestra recibida en la zona 17 de recepción de muestra fluya por acción capilar a lo largo del eje longitudinal de la tira 10 de prueba. Otro material poroso, tal como los materiales de matriz no absorbente descritos arriba también se puede usar. El soporte 13 sólido está formado por una membrana de nitrocelulosa. También se pueden usar otros materiales apropiados, tales como papel, membranas de nailon, vidrio, plástico, metal y similares.

- 15 En una realización específica, la tira 10 de prueba está diseñada para la detección de la proteína adhesina AP65 de *T. vaginalis* (analito), la zona de detección en IgG anti-AP65 de conejo conjugado de oro rayado y la zona de captura está rayada con IgG anti-AP65. Un procedimiento de ejemplo para producir la tira 10 de prueba se describe en los ejemplos 1 a 6.

- 20 La tira 10 de prueba puede estar alojada dentro de un alojamiento para facilitar el manejo de la tira. Las figuras 3 y 4 ilustran un casete 50 de tira de prueba que incluye una tira 10 de prueba encerrada dentro de un alojamiento 52. El alojamiento 52 está diseñado para permitir un agarre fácil por la persona que realiza el ensayo. El alojamiento 52 está compuesto de partes superior e inferior 54 y 56, respectivamente. La parte 56 inferior contiene un pozo 58 para recibir la tira 10 de prueba en la misma. La parte 56 superior incluye dos ventanas 60 y 62. La ventana 60 está adaptada para recibir una muestra de fluido. La ventana 62 es para ver el resultado del ensayo. En la porción 54 superior hay una clavija 64 que está alineada sobre el pozo 58, para anclar la tira de prueba en el pozo. Las dos partes se mantienen juntas alineadas mediante pasadores de esquina, tales como el pasador 66 en la parte 54, recibidos en orificios correspondientes, tal como el orificio 68, en la parte 56.

El alojamiento 52 puede construirse con cualquier material resistente al agua que tenga una resistencia apropiada, por ejemplo, cualquier material plástico, tal como polietileno, polipropileno, poliestireno y similares. Si se usa un material plástico, el alojamiento 52 se puede producir mediante cualquier técnica de moldeo convencional.

- 30 El casete 50 se puede ensamblar fácilmente colocando primero una tira 10 de prueba en el pozo 58 de la parte 56 inferior. La parte 54 superior se coloca entonces contra la parte inferior, alineándose la ventana 60 con la zona 17 de carga de muestras y siendo la ventana 62 alineada con las zonas de detección (captura) y de control 22, 24, la clavija 64 está en contacto con la almohadilla 28 absorbente. Las dos partes se pueden unir juntas, a través de pasadores y aberturas intercaladas.

- 35 El kit de la invención puede incluir una única tira de prueba como se describió anteriormente, o una pluralidad de las tiras de prueba. La pluralidad de tiras se puede diseñar para pruebas duplicativas o de detección de la presencia o ausencia de diferentes especies de *Trichomonas*, aislados o marcadores resistentes a fármacos, o diseñadas para analizar un panel de agentes adicionales de enfermedades tales como otras STD (*Chlamydia*, por ejemplo), u otros agentes causantes de vaginitis (*levadura Candida* y bacterias *Gardenerella*, por ejemplo) o múltiples dispositivos capaces de detectar varias especies animales de *Trichomonas*. El kit puede incluir herramientas de muestreo, por ejemplo, hisopos de algodón estériles para obtener una muestra endocervical, y un aparato de filtración y concentración de muestras. El kit también puede incluir soluciones de preparación de muestra, por ejemplo, soluciones reguladoras para neutralizar las muestras o para extraer/solubilizar el antígeno de *Trichomonas* en solución. Otros materiales útiles en la realización de los ensayos también se pueden incluir en los kits, que incluyen tubos de ensayo, pipetas de transferencia y similares. El aparato y los reactivos incluidos varían dependiendo de los tipos de pruebas realizadas y generalmente están dentro del conocimiento de los expertos en el arte.

- 50 En una realización preferida, el kit es para la detección de *T. vaginalis*. El dispositivo incluye un anticuerpo conjugado con oro DM116 generado contra la familia AP65 de proteínas adhesina contenidas dentro de la zona de detección, y un anticuerpo C55 o un fragmento del mismo, que se une específicamente a un epitopo AP65 distinto del unido por DM116, inmovilizado dentro de la zona de captura. En otra realización preferida, el kit incluye una solución reguladora que tiene un pH de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0. Preferiblemente, la solución reguladora es una solución reguladora de disolución de muestra que contiene aproximadamente 0.5% de Triton X-100 y 0.1% de BSA en agua doblemente destilada. El dispositivo, los reactivos de solución, los recipientes y las herramientas de muestreo generalmente se incluirán juntos y se empaquetarán del tipo convencional para kits de inmunoensayo, por ejemplo, cajas, bolsas, cilindros, tarjetas de envoltura retráctil y similares. Opcionalmente, el kit puede incluir además instrucciones escritas que determinan la etapa del método de la presente invención. Se puede usar cualquiera de varias soluciones reguladoras acuosas estándar, tales como fosfato, Tris, o una solución reguladora que contiene Triton X-100, BSA y agua destilada, a un pH entre aproximadamente 4.0 y

aproximadamente 9.0 para preparar la muestra biológica para el análisis. La selección de una solución reguladora apropiada está dentro del conocimiento de los expertos en el arte.

5 Cuando la orina es la muestra biológica, la muestra puede ser orina nativa, una porción fraccionada de orina nativa, o tratada de otro modo, por ejemplo, mediante filtración, ya sea en forma concentrada o en forma diluida. Un dispositivo de ejemplo para la filtración y prueba óptimas en un solo paso de muestras de prueba de orina contiene un sustrato de filtro que sirve como medio de soporte para los anticuerpos de prueba y control. El antígeno o el complejo antígeno/anticuerpo marcado se pone en contacto a medida que el líquido pasa sobre y a través del sustrato del filtro. Tales dispositivos de diagnóstico de flujo a través son conocidos para los expertos en el arte y este método es consistente con el método de esta invención. Se puede usar cualquier cantidad de soluciones reguladoras para diluir la orina nativa, siendo preferida Triton X-100 o soluciones reguladoras de fosfato a un pH entre aproximadamente 4.0 a aproximadamente 9.0. La fracción líquida y la fracción de partículas de la orina nativa se pueden analizar por separado. Las dos fracciones de la orina nativa se pueden separar mediante cualquiera de los métodos de separación sólido-líquido conocidos en la técnica, tales como, sedimentación, centrifugación o filtración y el líquido y las partículas se recogen por separado. Las partículas pueden luego resuspenderse en solución reguladora, por ejemplo, en una solución reguladora Triton X-100 para solubilizar o extraer la proteína de analito de interés. La suspensión se puede analizar entonces para detectar la presencia del analito. La fracción líquida de la orina separada se puede analizar tal como está, o pretratarse antes del análisis. El pretratamiento puede incluir concentración, dilución o neutralización.

20 En otra realización en la que un frotis vaginal es la muestra biológica, el fluido biológico contenido en el hisopo primero se solubiliza y se extrae en una solución reguladora. Un procedimiento de extracción de ejemplo se describe en el ejemplo 4. Una solución reguladora preferida incluye 0.5% de Triton X-100, 0.1% de BSA y agua doblemente destilada. También se puede usar cualquier otra solución reguladora, por ejemplo, soluciones reguladoras de fosfato que tengan intervalos de pH entre 4 y 9.

25 La muestra de fluido preparada (orina o frotis vaginal) se aplica luego a uno de los dispositivos de la invención, por ejemplo, tira 10 de prueba o casete 50 de prueba (figuras 1 y 3). Si se usa una tira de prueba, la tira se puede usar como una varilla de medición para extraer el fluido de muestra. Si se usa un casete 50 de prueba, el fluido de muestra se puede transferir usando una pipeta y colocarse en la ventana 60 de recepción de muestra. El fluido recibido fluye a lo largo de la matriz porosa bajo acción capilar hacia la zona de detección, la zona de captura y la zona de control. El resultado de la prueba se puede leer directamente de los marcadores capturados en la zona de captura y la zona de control. Una línea coloreada (roja, si la etiqueta es oro coloidal) en la zona de captura y la zona de control indica un resultado positivo para la detección de la infección por *Trichomonas*. Una línea de color en la zona de control solo indica un resultado negativo y la prueba no es válida. Ninguna línea indica que la prueba no es válida.

35 A partir de lo anterior, se apreciará cómo se cumplen diversos objetos y características de la invención. El ensayo es simple, rápido y se adapta fácilmente a la oficina de un médico o a la casa. De acuerdo con una característica importante de la invención, el ensayo es altamente sensible, recogiendo virtualmente todos los positivos en sujetos humanos infectados con *T. vaginalis* (véanse los ejemplos 4 y 5 a continuación). La característica de rendimiento de una realización del ensayo de la invención para la detección de infección por *T. vaginalis* se determinó a partir de un conjunto de muestras patrón de referencia compuesto (CRS). Este conjunto de muestras es una colección de muestras vaginales de 206 pacientes que presentan síntomas de vaginitis. Las muestras se analizaron para determinar la presencia de *T. vaginalis* mediante microscopía de montaje húmedo y el dispositivo de la invención. La discrepancia entre los dos ensayos se resolvió mediante el método de cultivo (cultivo In-pouch-Tv™, BioMed, Inc., San Jose, CA).

45 Se ha demostrado que el ensayo, incorporado en el dispositivo de prueba de la invención, identificó a todos los pacientes positivos de montaje húmedo (75) como positivos e identificó el 21% de pacientes negativos de montaje húmedo (28/131, confirmado por el método de cultivo) también como positivos con *T. vaginalis*. La sensibilidad del ensayo se informa aproximadamente en un 100%. La especificidad global del ensayo se informa al 98%. La capacidad de lograr tal alta sensibilidad y especificidad usando un protocolo de detección no pudo haber sido predicha antes del trabajo reportado en la presente solicitud. Los resultados se detallan en el ejemplo 5.

50 Además, las ventajas características del ensayo se consideran empleando orina como muestra de fluido corporal, permitiendo la recogida de muestras conveniente y privada, y la determinación del ensayo tanto para hombres como para mujeres. De forma similar, los reactivos inmunorreactivos del ensayo son fácilmente aplicables a una prueba de Papanicolaou o a los fluidos residuales de una prueba de Papanicolaou, lo que permite que el ensayo se incluya en uno o más ensayos que normalmente se realizan como parte de una prueba de Papanicolaou. Adicionalmente, los reactivos inmunorreactivos del ensayo son fácilmente aplicables a otros formatos de prueba rápida, tales como el tipo de ensayo de flujo continuo en el que la muestra fluye a través de una membrana o sustrato de filtro.

Los siguientes ejemplos describen aspectos específicos de la invención para ilustrar la invención y también proporcionan una descripción de métodos que se pueden usar para identificar y probar la presencia de *Trichomonas* en una muestra, y para ayudar a los expertos en el arte a comprender y poner en práctica la invención.

## Ejemplo 1

## Purificación de anticuerpos monoclonales

Se prepararon anticuerpos monoclonales anti-Trichomonas (Mabs) como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,707,442 de Alderete. Los Mabs se purificaron a partir de sobrenadante de cultivo o ascitis mediante cromatografía de proteína A-Sepharose (Goding, J Immunol Meth (1976) 42:17) (Pharmacia LKB). Aproximadamente 2 a 6 mL de fluido de ascitis producido a partir del hibridoma apropiado se diluyeron 1: 1 con solución reguladora de unión que contenía glicina 1.5 M, NaCl 3 M ajustado a pH de aproximadamente 8.9. Las ascitis de Mab DM116 se sometieron a diálisis con unión durante la noche a temperatura ambiente. La ascitis de Mab dializada se eluyó de la columna de cromatografía en gel de afinidad de proteína A-Sepharose CL-4B con la solución reguladora de unión a una velocidad de 0.5 mL/minuto. La elución se controló determinando la absorbancia de cada muestra a 280 nm, y la columna se lavó hasta que la absorbancia estuvo por debajo de 0.001 O.D. A continuación, se eluyó IgG de la columna usando solución reguladora de ácido cítrico 0.1 M ajustado a un pH aproximado de 4.0. La elución de inmunoglobulina se controló determinando la absorbancia de cada muestra a 280 nm.

## Ejemplo 2

## Preparación del conjugado de anticuerpo monoclonal de oro

Se calentó un matraz que contenía 100 mL de agua ultrapura a aproximadamente 80-85°C. Luego, con agitación suave, se adicionaron consecutivamente al agua caliente 1 mL de AuCl al 1% (2X0.5 mL) y 1.75 mL de solución de citrato de sodio al 1% (2X0.5, y luego alícuotas de 0.75 mL). La solución se calentó adicionalmente a 80-85 °C hasta que el color cambia de ligeramente amarillento a negro purpurino a vino de cereza.

En un tubo de vidrio, a 10 mL de la solución de oro 1: 1.75 preparada como anteriormente se adicionaron 200 µL de carbonato 100 mM recién preparado (100 mM). La solución se agitó en vórtex durante 3 segundos. Luego se adicionaron 300 µL de DM116 IgG (1 m/mL), y la solución se sometió a vórtex durante 3 segundos nuevamente. El tubo se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente, se adicionaron 100 µL de la solución de bloqueo del conjugado con agitación en vórtex durante 3 segundos, seguido de centrifugación a 8000 rpm durante 30 minutos. Se permitió que la centrifuga se detuviera por completo sin el uso del sistema de rotura. La solución de bloqueo del conjugado consiste en aproximadamente fosfato de potasio 25 mM (pH 7.4-7.6), aproximadamente 5% de albúmina de suero bovino y aproximadamente 0.10% de sacarosa. El sobrenadante se aspiró para dar un volumen residual de aproximadamente 300 µL. El conjugado concentrado se transfiere a un nuevo contenedor y se determina su volumen. El conjugado concentrado se diluye a una concentración 10X mediante la adición de la solución de resuspensión conjugada. La solución de resuspensión del conjugado contiene fosfato de potasio 25 mM (pH 7.4-7.6), albúmina de suero bovino al 1% y aproximadamente 0.10% de sacarosa. La cantidad de solución de resuspensión conjugada que se adicionó se determinó dividiendo el volumen total de la solución de oro por (10 - el volumen del conjugado concentrado que se transfiere al nuevo recipiente). El conjugado de anticuerpo monoclonal de oro se puede almacenar en un refrigerador, preferiblemente a aproximadamente 2-8 °C, hasta su uso.

## Ejemplo 3

## Preparación de la tira seca de ensayo

## A. Adición de anticuerpos inmovilizados a la tira seca

Una preparación de 1 mg/mL de IgG anti- *T. vaginalis* de conejo se dializó durante la noche a temperatura ambiente contra la solución reguladora de revestimiento que consistía en solución reguladora carbonato 50 mM-bicarbonato a pH 9.6. Luego, las IgG se cargaron en la plataforma de dispensación X-Y-Z (BIO.DOT INC.), y la máquina se programó para suministrar 1 µL/cm del líquido sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se secó luego a temperatura ambiente a 37 °C, durante aproximadamente 3 h. La solución reguladora de bloqueo (BSA al 0.5%, sacarosa al 4% en PBS) se pulverizó luego sobre la membrana, y la membrana se secó durante la noche a temperatura ambiente. La membrana se almacenó a aproximadamente 2-8 °C en ausencia de humedad.

## B. Aplicación del anticuerpo DM116 conjugado con oro en la zona de reacción

Se sumergió un papel de filtro de fibra de vidrio en la solución reguladora de pretratamiento con almohadilla de oro (poliol de alcohol al 0.5% (p/v), fosfato de di-sodio al 0.71% (p/v), Triton X-100 al 0.1% (v/v); 0.5% de BSA (p/v); DDW; pH 7.4). El papel de filtro de fibra de vidrio se secó en un horno a 40-50°C durante aproximadamente 3 horas, o se secó al aire durante la noche. El anticuerpo DM116 conjugado con oro se aplicó luego sobre el papel de filtro de fibra de vidrio tratado, seguido de ya sea secado al aire durante la noche a temperatura ambiente o secado en un horno a 37 °C hasta que la almohadilla parezca seca. La almohadilla se almacenó a aproximadamente 2-8 °C en ausencia de humedad.

C. Montaje de la tira de prueba

5 En la membrana de nitrocelulosa recubierta de anticuerpo preparada en la parte A, se colocó una tira de papel de filtro Whatman/Gelman (2.5 cm X 30.0 cm) de manera que los dos se superpusieron por 1 mm en la parte superior. Luego, la almohadilla de conjugado de oro preparada en la parte B se colocó de manera tal que se solapó con 1 mm en la parte inferior. La parte inferior de 1 mm de la almohadilla de conjugado de oro se superpuso con una segunda tira del papel de filtro Whatman/Gelman. El montaje se mantuvo en su lugar al cubrir con una capa de cinta adhesiva de plástico. Luego el montaje se corta en tiras más pequeñas de aproximadamente 2 mm de ancho y se almacena a aproximadamente 2-8 °C en ausencia de humedad.

Ejemplo 4

10 Procedimiento de prueba y resultados

El procedimiento de prueba que utiliza la tira de prueba de la invención es el siguiente:

15 1. Use un hisopo de algodón estéril para recolectar muestras de prueba del tracto vaginal del paciente. Procesar el hisopo tan pronto como sea posible después de recoger la muestra. Sin embargo, debido a que el ensayo de la invención no requiere organismos vivos para su procesamiento, el hisopo de muestra se puede almacenar y transportarse en forma seca. El hisopo también se puede almacenar a 2-8 °C durante hasta 24 horas antes de la extracción y la prueba. Alternativamente, el hisopo se puede extraer y la muestra extraída se puede almacenar a 2-8 °C durante hasta 24 horas.

20 2. Sumergir el hisopo en aproximadamente 1 mL de la solución reguladora de disolución de la muestra (0.5% de Triton X-100, 0.1% de BSA, DDW). Mezclar vigorosamente la solución girando el hisopo con fuerza contra el costado del contenedor al menos diez veces (mientras está sumergido). Los resultados de la prueba se obtienen cuando la muestra se extrae vigorosamente en la solución. Dejar que el hisopo se empape en la solución reguladora de muestra durante un minuto antes de volver a mezclar. Exprimir la mayor cantidad de líquido posible del hisopo presionándolo contra el costado del tubo y girándolo mientras retira el hisopo. Desechar el hisopo.

25 3. Insertar la tira de prueba de la varilla indicadora preparada en el ejemplo 7 en el vial de la solución de muestra de mezcla.

4. Leer los resultados a los 10 minutos (algunos resultados positivos se pueden ver antes). Si la prueba parece ser negativa después de diez minutos, esperar otros 10 minutos para que se disipe todo el color de fondo antes de confirmar el resultado de la prueba.

30 5. Una línea roja, incluso con sombreado de color desigual, se considera un resultado válido. En el caso de muestras positivas moderadas o altas, se puede ver algo de rojo detrás de la línea de prueba. Siempre que la línea de prueba y la línea de control estén visibles, los resultados son válidos. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Dos líneas - positiva. Una línea de prueba roja y una línea de control roja es un resultado positivo para la detección de antígenos de *Trichomonas*. Tener en cuenta que la línea roja puede ser de cualquier color.

- Una línea - negativa. Una línea de control roja, pero no una línea de prueba roja es un presunto resultado negativo.

35 • Sin líneas: prueba inválida. Si no aparece una línea de control roja o el color de fondo hace imposible leer la línea de control roja, el resultado no es válido.

40 La característica de rendimiento del ensayo de la invención se determinó a partir de un conjunto de muestras patrón de referencia compuesto (CRS). Este conjunto de muestras es una colección de muestras vaginales de 206 pacientes que presentan síntomas de vaginitis. Las muestras se analizaron para *Trichomonas* mediante microscopía de montaje húmedo y el ensayo de la invención. La discrepancia entre los dos métodos se resolvió mediante el método de cultivo (cultivo In-pouch-Tv™, BioMed, Inc., San José, CA) Véase, Alonzo and Pepe (1999).

45 Para el total de 206 muestras en el estándar de referencia compuesto, 75 se identifican como positivas y 131 se identifican como negativas por montaje húmedo. El dispositivo de la invención identificó todas las muestras positivas para montaje húmedo (75) como positivas y 101 muestras negativas para montaje húmedo como negativas. Sin embargo, el dispositivo identificó las muestras negativas restantes de montaje húmedo como positivas para la presencia de *T. vaginalis*.

50 Las 131 muestras negativas de montaje húmedo se analizaron adicionalmente mediante el método de cultivo para resolver la discrepancia entre el método de montaje húmedo y el dispositivo de la invención. Se encuentra que de las 30 muestras que se consideraron negativas para el montaje húmedo, pero positivas para el ensayo de la invención, 28 se encontraron positivas y 2 se encontraron negativas por el método de cultivo. además, se encuentra

que las 101 muestras que son negativas tanto por el método de montaje húmedo como por el ensayo de la invención también son negativas por el método de cultivo. El resultado se tabula en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

XENOSTRIP-TV EN COMPARACIÓN CON MICROSCOPIA DE MONTAJE HÚMEDO Y RESUELTO MEDIANTE CULTIVO

5

N = 206	Montaje húmedo (WM)		Resuelto WM (-) muestras (n=131)	
	(+)	(-)	Cultivo (c) (+)	Cultivo (c) (-)
XenoStrip-Tv™(+)	75	30	28	2
XenoStrip-Tv™ (-)	0	101	0	101

La realización del ensayo de la invención en comparación con la microscopía de montaje húmedo y resuelta por cultivo es la siguiente:

$$\text{Sensibilidad XenoStrip-Tv}^{\text{TM}} = \frac{X(+)\text{WM}(+) + X(+)\text{WM}(-)\text{C}(+)}{X(+)\text{WM}(+) + X(+)\text{WM}(-)\text{C}(+) + X(-)\text{WM}(+) + X(-)\text{WM}(-)\text{C}(+)}$$

$$= \frac{75 + 28}{75 + 28 + 0 + 0} = \frac{103}{103} = 100.0\% \text{ (C1 100\% - 100\%)}$$

$$\text{Especificidad XenoStrip-Tv}^{\text{TM}} = \frac{X(-)\text{WM}(-)\text{C}(-)}{X(-)\text{WM}(-)\text{C}(-) + X(+)\text{WM}(-)\text{C}(-)}$$

$$= \frac{101}{101 + 2} = \frac{101}{103} = 98.1\% \text{ (C1 95.4\% - 100\%)}$$

$$\text{NPV XenoStrip-Tv}^{\text{TM}} = \frac{X(-)\text{WM}(-)\text{C}(-)}{X(-)\text{WM}(-)\text{C}(-) + X(-)\text{WM}(+) + X(-)\text{WM}(-)\text{C}(+)}$$

$$= \frac{101}{101 + 0 + 0} = \frac{101}{101} = 1.000 \text{ (C1 1.000 - 1.000)}$$

$$\text{PPV XenoStrip-Tv}^{\text{TM}} = \frac{X(+)\text{WM}(+) + X(+)\text{WM}(-)\text{C}(+)}{X(+)\text{WM}(+) + X(+)\text{WM}(-)\text{C}(+) + X(+)\text{WM}(-)\text{C}(-)}$$

$$= \frac{75 + 28}{75 + 28 + 2} = \frac{103}{105} = 0.981 \text{ (C1 0.955 - 1.000)}$$

Se ha demostrado que los reactivos de anticuerpos utilizados para el ensayo de la invención son no reactivos con la flora vaginal normal, otros agentes de transmisión sexual (que incluyen *Gardenerella vaginalis* y especie *Candida*), y muestras urogenitales de individuos normales no infectados.

5 El dispositivo de anticuerpo de la invención detectó antígeno soluble presente en material derivado de frotis vaginal de 10-1000 organismos, una concentración inferior a la esperada de la descarga de pacientes.

El resultado del análisis por microscopía de montaje húmedo se comparó con el cultivo y los rendimientos de los métodos, el cultivo respecto al montaje húmedo y el montaje húmedo con respecto al cultivo se tabulan en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2

COMPARACIÓN DE LA MICROSCOPIA DE MONTAJE HÚMEDO CON EL CULTIVO				
N = 206	Cultivo			Rendimiento del montaje húmedo versus cultivo
	(+)	(-)		
Montaje húmedo (WM) (+)	66	28		Sensibilidad = 70.2%
Montaje húmedo (WM) (-)	28	103		Especificidad = 95.4%

10

Tabla 3

COMPARACIÓN DEL CULTIVO CON LA MICROSCOPIA DE MONTAJE HÚMEDO				
N = 206	Cultivo			Rendimiento del cultivo versus montaje húmedo
	(+)	(-)		
Cultivo (C) (+)	66	28		Sensibilidad = 88.0%
Montaje húmedo (WM) (-)	28	103		Especificidad = 78.6%

La tabla 4 compara el rendimiento del ensayo de la invención con el cultivo y la microscopía de montaje húmedo.

Tabla 4

COMPARACIÓN <sup>‡</sup> DE XENOSTRIP-TV™ CON EL CULTIVO Y LA MICROSCOPIA DE MONTAJE HÚMEDO					
N = 206	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	Exactitud
Cultivo	88.0%	78.6%	0.702	0.920	82.0%
Montaje húmedo	70.2%	92.0%	0.880	0.786	82.0%
XenoStrip-Tv™	100.0%	98.1%	0.981	1.000	99.0%
‡ los valores son CRS para XenoStrip-Tv™. Cultivo relativa al montaje húmedo y montura húmeda en relación con el cultivo.					

15

Ejemplo 5

Pruebas adicionales

Se realizó una evaluación del ensayo y dispositivo de la invención en tres consultorios médicos. Las pruebas en cada sitio fueron conducidas por personal con diversos niveles de estudios. Cada sitio analizó un panel codificado

## ES 2 646 176 T3

aleatoriamente de muestras negativas (3), positivas bajas (3), positivas medias (3) y positivas altas (3). Los resultados de la prueba obtenidos tuvieron un 100% de acuerdo con los resultados esperados.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, que comprende:

- 5 a) aplicar una muestra del sujeto a una zona de aplicación de muestra en un primer extremo de una tira seca, por lo que la muestra se mueve por acción capilar a lo largo de la tira seca hacia un segundo extremo, pasando así primero por una zona de reacción que comprende un primer anticuerpo monoclonal marcado no inmovilizado contra un epítipo de la proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis* y luego pasa a través de una zona de detección que comprende un segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado específico contra un epítipo de adhesina de *Trichomonas vaginalis*, en condiciones donde se formará un complejo antígeno/anticuerpo si el sujeto está infectado con *Trichomonas vaginalis*,
- 10 en el que la muestra es una muestra de orina, un hisopo endocervical, un frotis vaginal o una prueba de Papanicolaou, y en el que dicho primer y segundo anticuerpos monoclonales estaban presentes en la tira de prueba antes de la aplicación de la muestra, y
- en el que dichos primer y segundo anticuerpos monoclonales son específicos para diferentes epítipos en la misma proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis*, y
- 15 en el que dicho primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma DM116, y
- en el que dicho segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma C55; y
- 20 b) detectar la presencia de dicho complejo, por lo que la presencia de dicho complejo detecta la infección por *Trichomonas vaginalis* en dicho sujeto.

2. Un kit para la detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, que comprende una tira seca capaz de absorber un fluido aplicado a la misma por capilaridad dentro de la tira, teniendo dicha tira, en un sentido ascendente (en un primer extremo) a descendente (en un segundo extremo) y en el siguiente orden,

- 1) una zona de aplicación de muestra,
- 25 2) una zona de reacción, y
- 3) una zona de detección,
- en el que dicha zona de reacción comprende un primer anticuerpo monoclonal marcado no inmovilizado específico contra un epítipo de una proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis*, eficaz para formar con él, un complejo anticuerpo/proteína adhesina móvil, y dicha zona de detección comprende un segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado específico contra un epítipo de una proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis* en dicho complejo,
- 30 en el que dichos primer y segundo anticuerpos monoclonales están presentes en la tira antes de la aplicación de la muestra, y
- en el que dichos primer y segundo anticuerpos son específicos para diferentes epítipos en la misma proteína adhesina *Trichomonas vaginalis*, y
- 35 en el que dicho primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma DM116, y
- en el que dicho segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma C55, y
- 40 en el que, después de la aplicación de una muestra de fluido corporal a la zona de aplicación de muestra en el primer extremo,
- (i) la muestra migra en sentido descendente en la tira hacia la zona de reacción,
- (ii) la proteína adhesina en la muestra reacciona con el primer anticuerpo monoclonal previamente presente en la zona de reacción para formar un complejo anticuerpo/proteína adhesina marcado móvil
- 45 (iii) el complejo anticuerpo/proteína adhesina marcado móvil migra hacia la zona de detección en el segundo extremo,

(iv) el complejo anticuerpo/proteína adhesina marcado móvil se une al segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado previamente presente en la zona de detección, inmovilizando así dicho complejo en la zona de detección.

5 3. Una tira seca de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, siendo dicha tira capaz de absorber un fluido aplicado a la misma por capilaridad dentro de la tira, teniendo dicha tira, en un sentido ascendente (en un primer extremo) a descendente (en un segundo extremo) y en el siguiente orden,

1) una zona de aplicación de muestra,

2) una zona de reacción, y

3) una zona de detección,

10 en el que dicha zona de reacción comprende un primer anticuerpo monoclonal marcado no inmovilizado específico contra un epítipo de una proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis*, eficaz para formar con él, un complejo anticuerpo/proteína adhesina móvil, y dicha zona de detección comprende un segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado específico contra un epítipo de una proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis* en dicho complejo,

en el que dichos primer y segundo anticuerpos monoclonales son específicos para diferentes epítipos en la misma proteína adhesina de *Trichomonas vaginalis*, y

15 en el que dicho primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma DM116, y

en el que dicho segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-AP65 producido por la línea celular de hibridoma C55.

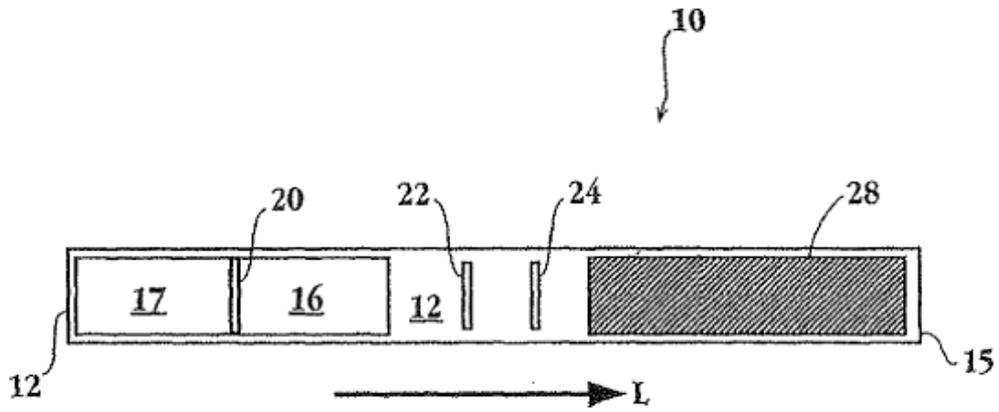


Fig. 1

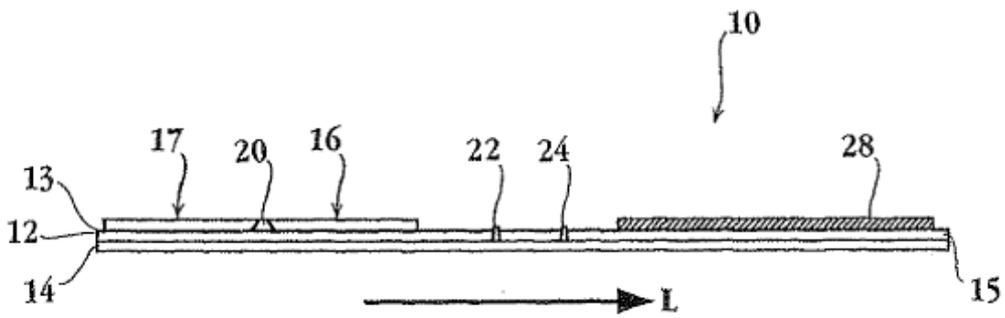
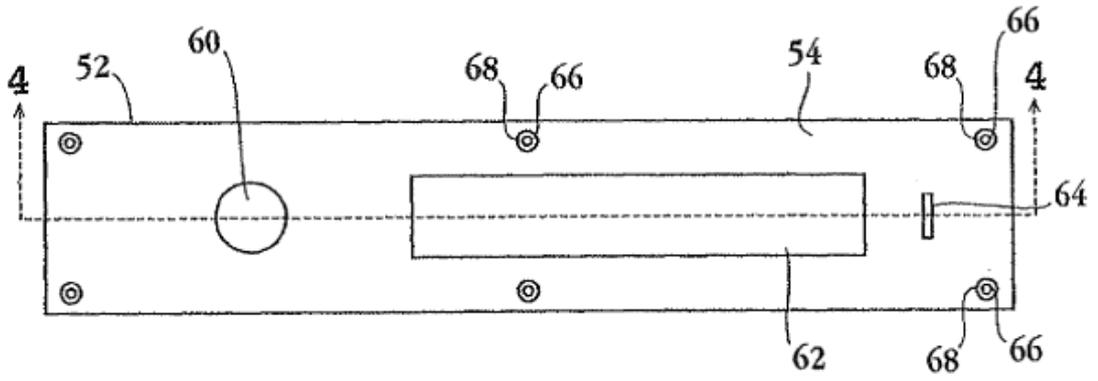
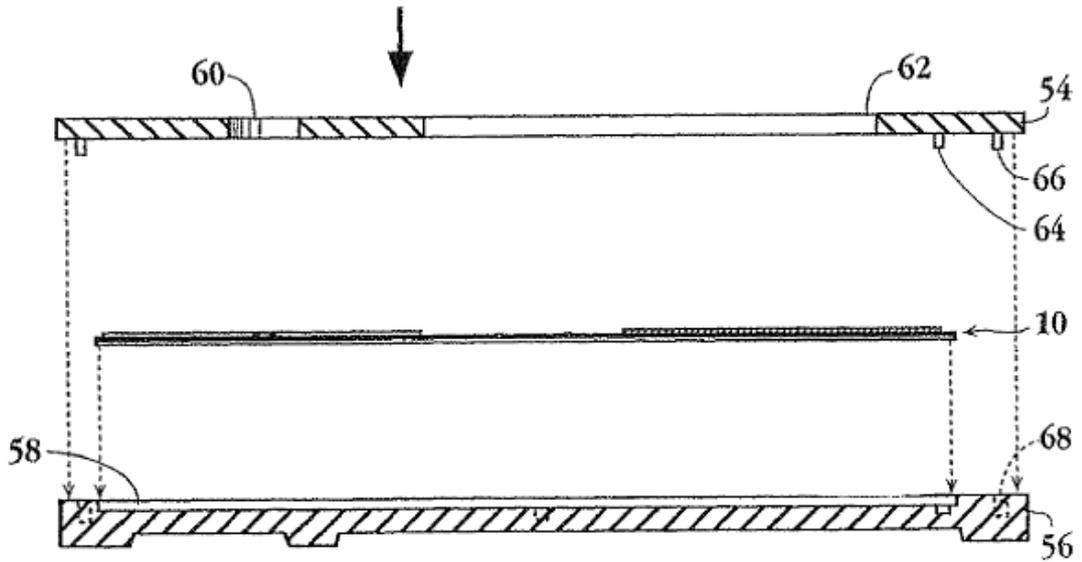


Fig. 2



**Fig. 3**



**Fig. 4**