

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 402**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2014 PCT/US2014/035512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14176535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2014 E 14789058 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2989463**

54 Título: **Ensayo multiplex para Hepatitis B**

30 Prioridad:

26.04.2013 US 201361816518 P

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

03.05.2019

73 Titular/es:

**BIO-RAD LABORATORIES, INC. (100.0%)
1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547, US**

72 Inventor/es:

**KAUL, RAVI;
ZHENG, WEIMING y
WALKER, ROGER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 711 402 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

Ensayo multiplex para Hepatitis B

5

Antecedentes de la invención

El virus de la Hepatitis B causa enfermedad hepática. Una cantidad significativa de pacientes infectados desarrollan hepatitis crónica que conduce a daño hepático y hepatocarcinoma posterior. La infección por hepatitis B se caracteriza por varias respuestas serológicas e inmunológicas distintivas. Los perfiles de infección temporales pueden servir como una guía útil para monitorear el curso de la enfermedad y proporcionar, además, correlación serológica con el progreso de la enfermedad (véase, por ejemplo, Elgouhari (2008) Cleveland Clinic J. Med. 75:881 y Juszczak (2010) Vaccine 18:S23). El documento US2013/085075 describe un procedimiento de monitoreo de salud hepática en un paciente mediante la medición de (a) un marcador biológico o panel de marcadores biológicos de salud hepática y (b) un nivel de un marcador biológico de uno de los principales virus de hepatitis A, B, C, D y E, cuyas mediciones se comparan luego con una muestra de control para diagnosticar la presencia o ausencia de un desorden hepático.

10

15

20

25

El virus de la Hepatitis B contiene dos proteínas virales principales, el antígeno de superficie (HBsAg) y los antígenos de núcleo (HBcAg). Al infectarse, el HBsAg se vuelve detectable en primer lugar, lo que continúa con la aparición de anti-HBc IgM generados por el huésped. Los anticuerpos anti-HBs aparecen meses después de la desaparición de HBsAg, y permanecen detectables indefinidamente. Durante el "período de ventana" (cuando existe un intervalo de 16-32 semanas entre la aparición de HBsAg y la aparición de anti-HBs), la presencia de anti-HBc proporciona evidencia serológica de la infección por HBV actual o reciente. Sin embargo, la presencia de anti-HBc IgM y anti-HBc (IgM e IgG) no indica la resolución de la infección ni la inmunidad protectora. Además, la presencia de anti-HBs en la ausencia de HBsAg y anti-HBc indica que una persona que se ha vacunado exitosamente.

30

35

40

45

La prueba serológica de la hepatitis B incluye mediciones de varios antígenos y anticuerpos específicos para el virus de la hepatitis B. La capacidad de seguir el curso de la infección por HBV y diferenciar entre, por ejemplo, infección, exposición, y resolución, resulta importante para la gestión clínica. Todos los kits de prueba de anticuerpos para Hepatitis B que se disponen comercialmente realizan una prueba por vez por recipiente de reacción. El resultado de una cualquiera de las pruebas dadas no puede predecir el curso o etapa de la infección por Hepatitis B o resolución, de manera tal que deben realizarse múltiples pruebas, que consumen tiempo, muestra, y reactivos. Además, un proveedor médico puede que no ordene probar todos los marcadores de HBV relevantes al mismo tiempo, de manera tal que se puede llamar a un sujeto para prueba en múltiples ocasiones. Las repetidas extracciones de sangre resultan estresantes y costosas, y pueden dar como resultado incumplimiento y tratamiento menos que óptimo. Véase, por ejemplo, Stramer et al. (2012) Transfusion 52:440. El documento WO94/24560 describe un inmunoensayo para medir dos o más patógenos diferentes en una muestra líquida para prueba mediante el contacto de la muestra con una fase sólida en la que los anticuerpos se inmovilizan y la fase sólida se contacta posteriormente con dos o más antígenos diferentes. El documento US2009/029348 describe un kit para ensayo sándwich de doble antígeno para anticuerpos de Hepatitis C, en el que un antígeno primario captura el anticuerpo y el mismo anticuerpo captura el antígeno secundario. El documento GB 2 051 357 describe un procedimiento para detectar de manera simultánea en una muestra, al menos, dos marcadores diferentes, en el que el procedimiento comprende el contacto de la muestra con un solo reactivo de fase sólida que se recubre con, al menos, dos inmunoreactivos diferentes no complementarios.

Breve resumen de la invención

50

55

60

En la presente se proporcionan kits para detección simultánea de múltiples anticuerpos contra el virus de la Hepatitis B (HBV) en una muestra de sujeto de manera tal que el estado de HBV del sujeto puede determinarse. El kit que se describe en el presente proporciona un ensayo rápido, eficiente para determinar si un sujeto se ha expuesto a HBV, sufre de infección por HBV, ha sufrido de infección por HBV en el pasado, o se ha inmunizado contra el HBV. Tales kits comprenden (a) un primer receptáculo que comprende (i) perlas que se conjugan con antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg) de humano y marcador detectable (i), (ii) perlas que se conjugan con antígeno de núcleo de Hepatitis B (HBcAg) de humano y marcador detectable (ii), y (iii) perlas que se conjugan con un anticuerpo específico para IgM (anti-IgM) de humano y marcador detectable (iii); (b) un segundo receptáculo que comprende (i) HBsAg biotinilado, y (ii) HBcAg biotinilado; y (c) un tercer receptáculo que comprende estreptavidina que se conjuga con un marcador detectable (iv). En algunas realizaciones, los marcadores detectables son una combinación distintiva de fluorófonos. En algunas realizaciones, las perlas responden magnéticamente.

65

En algunas realizaciones, el marcador detectable (iv) se selecciona a partir de ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

En algunas realizaciones, el kit comprende, además, reactivos de lavado (por ejemplo, listo para usar, una solución madre concentrada, o polvo). El kit puede comprender, además, un recipiente que comprende materiales o reactivos para citometría de flujo, por ejemplo, soluciones madre reguladoras o polvos y tubos adecuados. En algunas realizaciones, el kit comprende además un receptáculo que comprende un control de calibración, por ejemplo, para

configurar el nivel de señal para considerarse positiva. El kit puede incluir controles de calibración para más de un marcador detectable. En tales casos, los controles de calibración pueden encontrarse en un receptáculo o más de un receptáculo. El kit puede incluir controles de calibración en más de un nivel para, al menos, un marcador detectable. El kit puede comprender, al menos, un receptáculo que comprende un control negativo, por ejemplo, con perlas no marcadas.

Se proporcionan además ensayos multiplex para procesamiento de una muestra biológica a partir de un sujeto humano y/o determinación del estado de infección por HBV del sujeto. De acuerdo con esto, se proporcionan ensayos para procesamiento de una muestra biológica a partir de un sujeto humano que comprenden (a) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de perlas en un receptáculo, en los que la mezcla de perlas comprende (i) perlas que se conjugan con HBsAg y marcador detectable (i), (ii) perlas que se conjugan con HBcAg y marcador detectable (ii), y (iii) perlas que se conjugan con anti-IgM (por ejemplo, anti-IgM de humano) y marcador detectable (iii); (b) retirar componentes que no se unen a perlas; (c) poner en contacto la mezcla de perlas con reactivo conjugado 1 en los que el reactivo conjugado 1 comprende (i) HBsAg biotinilado, y (ii) HBcAg biotinilado; (d) retirar componentes que no se unen a perlas; (e) poner en contacto la mezcla de perlas con reactivo conjugado 2 en los que el reactivo conjugado 2 comprende estreptavidina que se conjuga con marcador detectable (iv); (f) retirar componentes que no se unen a perlas; y (g) determinar mediante citometría de flujo un resultado positivo o negativo para el marcador detectable (iv) en perlas que son también positivas para cada uno de los marcadores detectables (i), (ii), o (iii), procesando así la muestra biológica a partir del sujeto humano y/o determinando el estado de infección por Hepatitis B del sujeto.

En algunas realizaciones, los marcadores detectables son una combinación distintiva de fluorófonos. En algunas realizaciones, las perlas responden magnéticamente.

En algunas realizaciones, una, dos o todas las etapas (b), (d), y (f) comprenden lavado de las perlas. En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona a partir de sangre, componentes de la sangre (por ejemplo, suero o plasma), o sangre procesada.

En algunas realizaciones del ensayo, el positivo y negativo se determinan mediante comparación con respecto a un control de calibración. El positivo se define como más alto con respecto al control de calibración, y el negativo se define como más bajo con respecto al control de calibración.

En algunas realizaciones, el ensayo comprende además determinar que el sujeto sufre de infección aguda por Hepatitis B cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (iii). En algunas realizaciones el ensayo comprende además determinar que el sujeto ha sido inmunizado contra la infección por Hepatitis B cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (i), pero no en perlas (ii) o (iii). En algunas realizaciones, el ensayo comprende además determinar que el sujeto ha si expuesto a Hepatitis B cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (ii) pero no en perlas (i) o (iii). En algunas realizaciones, el ensayo comprende además determinar que el sujeto ha tenido una infección por Hepatitis B en el pasado cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (i) y (ii) pero no en perlas (iii).

En algunas realizaciones, los marcadores detectables (i), (ii), y (iii) son combinaciones distintivas de fluorófonos. En algunas realizaciones, el marcador detectable (iv) se selecciona a partir de PE y FITC.

En algunas realizaciones, las perlas (i), (ii), y (iii) responden magnéticamente. En algunas realizaciones, una, dos, o todas las etapas (b), (d), y (f) comprenden lavado de perlas. En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona a partir de sangre, componentes de la sangre (por ejemplo, suero o plasma), o sangre procesada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una realización del ensayo multiplex para HBV que se describe en el presente.

Descripción detallada de la invención

A. Introducción

En la presente se describen kits, composiciones, y procedimientos para detección simultánea de una infección con un microorganismo y/o la respuesta a la vacunación contra la misma infección. El procedimiento incluye la detección de anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) contra el antígeno de superficie de Hepatitis B de humano (anticuerpos anti HBsAg) en combinación con inmunoglobulinas totales (anticuerpos HBc totales) e inmunoglobulinas M (anticuerpos anti-HBc IgM) que se dirigen contra el antígeno de núcleo de Hepatitis B de humano. La presencia y cantidad de cada uno de los anticuerpos se mide en el mismo recipiente único (tubo, pozo, cubeta) en la presencia de perlas. Cada perla lleva un parámetro físico específico detectable (por ejemplo, marca de colorante), y (1) anti-IgM, (2) HBcAg, o (3) HBsAg. De este modo, tres tipos de perlas detectables de manera clara se incluyen en un recipiente único para llevar a cabo un ensayo, según se muestra en la Figura 1. La Figura 1 indica que las perlas de

HBsAg se recubrieron con los dos subtipos predominantes de HBsAg, Ad y Ay. Existen subtipos adicionales, por ejemplo, Aw y Ar (véase, por ejemplo, Valet et al. (1975) CMA J. 112:1179).

5 Los ensayos que se describen en el presente ofrecen detección en, al menos, dos dimensiones, por ejemplo, la identidad de la perla inmovilizada (por ejemplo, HBsAg, HBcAg, o anti-IgM), y la presencia y cantidad de unión de anticuerpo (anti-HBs o anti-HBc). Este aspecto multidimensional permite un formato multiplex, de manera tal que más de un analito puede detectarse en un solo ensayo. Además, según se describe a continuación, los inventores han mostrado que el ensayo multiplex que se describe en el presente resulta correlacionado de manera exitosa con el estado de infección de muestras de pacientes conocidas.

15 Los inventores han diseñado un ensayo simple, que se describe brevemente aquí, para detectar múltiples anticuerpos en una muestra de paciente que son indicadores de la presencia de una infección por HBV, etapa de infección por HBV, y estado de la vacunación contra HBV del paciente. En la primera etapa, la muestra del paciente, normalmente sangre o un componente de la sangre, se pone en contacto con tres tipos de soporte sólido:

ss1) que se conjuga con un marcador detectable (por ejemplo, fluorófono) 1 y anti-IgM;

20 ss2) que se conjuga con un marcador detectable 2 y HBcAg; y

ss3) que se conjuga con un marcador detectable 3 y HBsAg.

25 Ss1 se unirá a todos los anticuerpos IgM en la muestra de paciente, independientemente de la especificidad. Ss2 se unirá a anticuerpos en la muestra de paciente que son específicos para HBcAg, tanto IgM y IgG. Ss3 se unirá a anticuerpos en la muestra de paciente que son específicos para HBsAg, predominantemente IgG.

30 Después de retirar el material no unido, se agregan HBcAg y HBsAg marcados. En el ejemplo que se muestra en la Figura 1, el marcador es biotina, pero una persona experta comprenderá que un marcador detectable puede usarse directamente en el HBcAg y HBsAg para dar como resultado una señal positiva o negativa.

35 En el presente ejemplo, después de retirar el material no unido, se agrega estreptavidina marcada para ser detectada, se une a HBcAg y HBsAg biotinilados, y da como resultado una señal positiva o negativa, así como también cuantitativa. Los soportes sólidos 1, 2, 3 (que se correlacionan con marcadores 1, 2, y 3 detectables), y la presencia, ausencia, y nivel cuantitativo de señal en cada uno, se detectan mediante citometría de flujo. La siguiente Tabla muestra cómo se pueden usar los resultados para diagnosticar el estado de HBV del paciente.

	Marcador detectable 1 + (IgM +)	Marcador detectable 2 + (anti-HBc +)	Marcador detectable 3 + (anti-HBs +)
No expuesto	-	-	-
Expuesto	-	+	-
Infección aguda	+	+	-
Infección pasada	-	+	+
Inmunizado	-	-	+

B. Definiciones

40 A menos que se especifique lo contrario, los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado según se comprende comúnmente por una persona de capacidad ordinaria en el estado de la técnica. Véase, por ejemplo, Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (4th ed. 2007); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). La presente divulgación se refiere a ítems tales como marcadores, soportes sólidos, perlas y analitos de acuerdo con un número o letra (por ejemplo, Marcador detectable 1 o perla (ii)). Estos números y letras se dirigen a distinguir el ítem con respecto a otros ítems del mismo tipo (por ejemplo, perla (i) vs. perla (ii)), y no se dirigen a asociar una propiedad específica al número o letra.

50 Los ensayos multiplex son análisis que miden de manera simultánea los niveles de más de un analito en una muestra única. Procedimientos de ensayos multiplex y reactivos se describen en, por ejemplo, la patente US 6,773,578 y WO2008148883.

- 5 El término “soporte sólido” se usa en la presente para indicar una superficie o cuerpo inerte sólido en que un agente, tal como un anticuerpo o un antígeno puede encontrarse inmovilizado. El término “inmovilizado” según se usa en la presente indica un acoplamiento que se basa en moléculas que no se desacopla significativamente en condiciones que se imponen durante las etapas de los ensayos que se describen en la presente. Tal inmovilización puede lograrse a través de un enlace covalente, un enlace iónico, un enlace de tipo afinidad, o cualquiera de los otros enlaces químicos.
- 10 El término “partícula” se usa en la presente para referirse a un cuerpo sólido o semisólido, frecuentemente con dimensiones lineales en la escala de micrón (a saber, menos que 100 μm), de cualquier forma o textura superficial. Excepto por lo señalado, el término se usa de manera indistinta con “micropartícula”, que se refiere a una partícula en escala de micrón, y “perla”, que se refiere a partículas que son de forma esférica o casi esféricas, frecuentemente poliméricas en composición.
- 15 Los términos “receptáculo”, “recipiente”, “tubo” y “pozo” se refieren a un recipiente que puede mantener reactivos o un ensayo. Si el receptáculo es un kit y mantiene reactivos, se cerrará o sellará normalmente. Si el receptáculo se usa para un ensayo, se abrirá o se volverá accesible normalmente durante las etapas del ensayo.
- 20 El término “muestra biológica” abarca una variedad de tipos de muestras que se obtienen a partir de un organismo. El término abarca fluidos corporales tales como sangre, componentes de la sangre, saliva, suero, plasma, orina y otras muestras líquidas de origen biológico, biopsia de tejido sólido, cultivos de tejido, o sobrenadantes que se toman a partir de células de paciente cultivadas. En el contexto de la presente divulgación, la muestra biológica es normalmente un fluido corporal con cantidades detectables de anticuerpos, por ejemplo, sangre o un componente de la sangre. La muestra biológica puede procesarse antes del ensayo, por ejemplo, para retirar células o desechos celulares. El término abarca muestras que se han manipulado después de su procuración, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización, sedimentación o enriquecimiento de ciertos componentes.
- 25 El término “anticuerpo” según se usa en la presente se refiere a un polipéptido que se codifica mediante un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de estos, que se unen específicamente y reconocen un analito (antígeno). Las cadenas ligeras de inmunoglobulina que se reconocen se clasifican en ya sea kappa o lambda. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina se clasifican en gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que definen, a su vez, las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.
- 30 Un ejemplo de una unidad estructural de inmunoglobulina G (anticuerpo IgG) es un tetrámero. Cada tetrámero como tal se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada para una cadena “ligera” (de alrededor de 25kD) y una cadena “pesada” (de alrededor de 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. Los términos “cadena ligera variable” (VL) y “cadena pesada variable” (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.
- 35 Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como fragmentos bien caracterizados que se producen mediante digestión de inmunoglobulinas intactas con diversas peptidasas. De este modo, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo cerca de las uniones de disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que por sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 mediante un enlace disulfuro. El dímero $F(ab')_2$ puede reducirse en condiciones leves para romper la unión de disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero $F(ab')_2$ en dos monómeros Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase Paul (Ed.), Fundamental Immunology, Third Edition, Raven Press, NY (1993)). Mientras diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, una persona experta apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o mediante la utilización de metodología de ADN recombinante. De este modo, el término “anticuerpo”, según se usa en la presente, incluye además fragmentos de anticuerpos que se producen ya sea mediante la modificación de anticuerpos enteros o mediante síntesis de novo usando metodologías de ADN recombinante tal como cadena única de Fv.
- 40 Los anticuerpos se refieren comúnmente de acuerdo con sus objetivos. Mientras que la nomenclatura varía, una persona experta en la técnica estará familiarizada y comprenderá que varios nombres pueden aplicarse al mismo anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo específico para IgM puede denominarse “anti-IgM”, “anticuerpo IgM”, o “anticuerpo anti-IgM”.
- 45 Los términos “antígeno”, “inmunógeno”, “objetivo de anticuerpo” y “analito objetivo” se usan en la presente para referirse a una molécula, compuesto, o complejo que se reconoce mediante un anticuerpo, a saber, puede unirse específicamente mediante el anticuerpo. El término puede referirse a cualquier molécula que puede reconocerse específicamente mediante un anticuerpo, por ejemplo, un polipéptido, polinucleótido, carbohidrato, lípido, molécula química, o combinaciones de estos (por ejemplo, polipéptidos fosforilados o glucosilados). Una persona experta comprenderá que el término no indica que la molécula es inmunogénica en todo contexto, sino que indica simplemente que puede ser objetivo de un anticuerpo.
- 50
- 55
- 60
- 65

Los anticuerpos se unen a un "epítopo" en un antígeno. El epítopo es el sitio que se localiza en el antígeno que se reconoce y se une mediante el anticuerpo. Los epítopos pueden incluir unos pocos aminoácidos o porciones de unos pocos aminoácidos, por ejemplo, 5 o 6, o más, por ejemplo, 20 o más aminoácidos, o porciones de aquellos aminoácidos. En algunos casos, el epítopo incluye componentes no proteínicos, por ejemplo, a partir de un carbohidrato, ácido nucleico, o lípido. En algunos casos, el epítopo es una molécula tridimensional. De este modo, cuando el objetivo es una proteína, el epítopo puede comprender aminoácidos consecutivos, o aminoácidos de diferentes partes de la proteína que se aproximan mediante plegamiento de proteína (por ejemplo, un epítopo discontinuo). Lo mismo resulta verdadero para otros tipos de moléculas objetivo que forman estructuras tridimensionales. Un epítopo incluye normalmente, al menos, 3, y más comúnmente, al menos, 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Entre los procedimientos para determinar la conformación espacial de epítopos se incluyen, por ejemplo, cristalografía por rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Los términos "específico para" y "se une específicamente a" se refieren a una molécula (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a su objetivo con, al menos, afinidad mayor que 2-plegues en comparación con los compuestos no objetivos, por ejemplo, al menos, cualquiera de afinidad mayor que 4-plegues, 5-plegues, 6-plegues, 7-plegues, 8-plegues, 9-plegues, 10-plegues, 20-plegues, 25-plegues, 50-plegues, o 100-plegues. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un objetivo de anticuerpo dado unirá normalmente el objetivo de anticuerpo con al menos una afinidad mayor que 2-plegues en comparación con un no objetivo de anticuerpo. Específicamente puede determinarse usando procedimientos estándares, por ejemplo, inmunoensayos ELISA de fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998) para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica).

El término "se une" con respecto a un objetivo de anticuerpo (por ejemplo, antígeno, analito) indica normalmente que un anticuerpo se une a una mayor parte de los objetivos de anticuerpo en una población pura (asumiendo proporciones molares adecuadas). Por ejemplo, un anticuerpo que se une a un objetivo de anticuerpo dado se une normalmente a, al menos, 2/3 de los objetivos de anticuerpo en una solución (por ejemplo, al menos, cualquiera del 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %). Una persona experta reconocerá que alguna variabilidad surgirá dependiendo del procedimiento y/o umbral de la unión determinante.

Los términos "marcador", "marcador detectable" y "molécula detectable" se refieren a una composición detectable mediante espectroscopia, medios fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen colorantes fluorescentes (fluorófonos), agentes luminiscentes, reactivos electrón-densos, enzimas (por ejemplo, según se usan normalmente en ELISA), biotina, digoxigenina, ³²P y otros isótopos, haptenos, y proteínas que pueden volverse detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de un radiomarcador en el péptido o se usan para detectar anticuerpos que reaccionan específicamente con el péptido. El término incluye combinaciones de agentes marcadores únicos, por ejemplo, una combinación de fluorófonos que proporcionan una marca detectable única, por ejemplo, en una longitud de onda en particular o combinación de longitudes de onda. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica para conjugar un marcador con respecto a un agente conveniente usando, por ejemplo, procedimientos que se describen en Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego.

El término "positivo" cuando se refiere a un resultado o señal, indica la presencia de un analito o ítem que se detecta en una muestra. El término "negativo" cuando se refiere a un resultado o señal, indica la ausencia de un analito o ítem que se detecta en una muestra. Positivo y negativo se determinan normalmente mediante comparación de, al menos, un control, por ejemplo, un nivel de umbral que se requiere para que una muestra se determine como un control positivo o negativo (por ejemplo, un blanco conocido).

Una muestra de "control" o valor se refiere a una muestra que sirve como una referencia, comúnmente una referencia conocida, para comparación con respecto a una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba puede tomarse a partir de una condición de prueba, por ejemplo, en la presencia de un compuesto de prueba, y compararse con muestras a partir de condiciones conocidas, por ejemplo, en la ausencia del compuesto de prueba (control negativo), o en la presencia de un compuesto conocido (control positivo). Un control puede representar además un valor promedio que se recolecta a partir de un número de pruebas o resultados. Una persona experta en la técnica reconocerá que los controles son valiosos en una situación dada y pueden analizar datos sobre la base de comparaciones con respecto a valores de control. Los controles son valiosos además para determinar los significados de datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado son variables en los controles, la variación en muestras de prueba no se considerará como significativa.

Un "control de calibración" resulta similar con respecto a un control positivo, en cuanto a que incluye una cantidad conocida de un analito conocido. En el caso de un ensayo multiplex, el control de calibración puede diseñarse para incluir cantidades conocidas de múltiples analitos conocidos. La cantidad de analito(s) en el control de calibración puede configurarse a una cantidad de corte mínima, por ejemplo, de manera tal que una cantidad mayor se considerará "positivo" para el analito(s), mientras que una cantidad menor se considerará "negativo" para el analito(s). En algunos casos, pueden usarse los controles de calibración de múltiples niveles, de manera tal que un rango de cantidades de analito puede determinarse más precisamente. Por ejemplo, un ensayo puede incluir

controles de calibración en cantidades bajas y altas conocidas, o cantidades máximas, intermedias, y mínimas conocidas.

5 El término “diagnóstico” se refiere a una probabilidad relativa de que un sujeto sufre de una infección, desorden o enfermedad. De manera similar, el término “pronóstico” se refiere a una probabilidad relativa con respecto a que puede ocurrir un cierto resultado futuro en el sujeto. Por ejemplo, en el contexto de la presente divulgación, el pronóstico puede referirse a la probabilidad de que una persona se infectará en el futuro (por ejemplo, no probable si se inmunizó). Los términos no pretenden ser absolutos, según se apreciará por cualquier persona experta en el campo de diagnósticos médicos.

10 “Sujeto”, “paciente”, y “persona” se usan de manera indistinta y se refieren a, a excepción de cuando se indica, mamíferos, tales como primates humanos y no humanos, así como también conejos, ratas, ratones, cabras, cerdos, y otras especies de mamíferos. El término no indica necesariamente que el sujeto se ha diagnosticado con una enfermedad en particular, pero se refiere normalmente a una persona bajo supervisión médica. Un paciente puede ser una persona en busca de tratamiento, monitoreo, ajuste o modificación de un régimen terapéutico existente.

C. Ensayos multiplex

20 Los ensayos que se describen en el presente incluyen detección de más de un analito en un único ensayo, y se describen, de este modo, como ensayos multiplex. Los ensayos que se describen en el presente incluyen componentes para inmovilizar múltiples analitos en soportes sólidos distinguibles de manera tal que cada uno de los múltiples analitos puede identificarse y cuantificarse mediante citometría de flujo. Los componentes de ensayo y consideraciones incluyen los soportes sólidos y cómo distinguir los diferentes tipos de soportes sólidos unos con respecto a los otros (por ejemplo, marcadores u otros parámetros de diferenciación), componentes para inmovilizar los analitos convenientes de manera específica y retirar otros materiales de muestra, y marcadores para detectar y cuantificar los analitos convenientes.

25 Los ensayos múltiple que se describen en el presente incluyen el uso de un soporte sólido, normalmente partículas (a las que se hace referencia además, como micropartículas o perlas). Para detección mediante citometría de flujo, las partículas que emiten autofluorescencia deberían evitarse debido a que incrementarán señales de fondo y las representarán de manera no adecuada. Las partículas que se crean mediante polimerización en emulsión estándar a partir de una variedad de monómeros de partida exhiben, de manera general, baja autofluorescencia, mientras que aquellas que han sido modificadas para aumentar la porosidad (partículas “macroporosas”) exhiben alta autofluorescencia. La autofluorescencia en tales partículas aumenta además con el aumento de tamaño y el aumento de porcentaje del monómero divinilbenceno.

30 Dentro de estas limitaciones, el rango de tamaño de las micropartículas puede variar y los rangos de tamaño en particular no son críticos. En la mayoría de los casos, el rango de tamaño agregado de las micropartículas yace dentro del rango de 0,3 μm a 100 μm en diámetro de partículas, por ejemplo, dentro del rango de 0,5 μm a 40 μm .

35 Las partículas magnéticas se usan comúnmente en el estado de la técnica y pueden hacer que las etapas de separación y lavado resulten más convenientes para los ensayos que se describen en el presente. “Partículas magnéticas”, “material que responde magnéticamente” y “perlas magnéticas” indican un material que responde a un campo magnético. Materiales que responden magnéticamente incluyen materiales paramagnéticos (por ejemplo, hierro, níquel, y cobalto, así como también, óxidos de metal tales como Fe_3O_4 , $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$, CoO , NiO , Mn_2O_3 , Cr_2O_3 , y CoMnP), materiales ferromagnéticos, materiales ferrimagnéticos, y materiales metamagnéticos. En lugar de constituir la micropartícula entera, el material que responde magnéticamente constituye normalmente un componente de la micropartícula, mientras que el resto consiste de un material polimérico que puede derivatizarse químicamente para permitir la fijación de un reactivo de ensayo (por ejemplo, antígeno o anticuerpo).

40 Procedimientos de, e instrumentación para, aplicación y retiro de un campo magnético como parte de un ensayo se conocen para aquellos capacitados en el estado de la técnica y se informan en la literatura. Ejemplos de informes de literatura son Forrest et al., US 4,141,687; Ithakissios, US 4,115,534; Vlieger et al., Analytical Biochemistry 205:1-7 (1992); Dudley, Journal of Clinical Immunoassay 14:77-82 (1991); and Smart, Journal of Clinical Immunoassay 15:246-251 (1992).

45 La matriz polimérica que forma la micropartícula puede ser cualquier material que es compatible con los ensayos que se describen en el presente. La matriz debería ser inerte con respecto a los componentes de la muestra biológica y a los reactivos de ensayo, tener autofluorescencia múltiple, ser sólida e insoluble en la muestra y en cualquiera de los otros reactivos o lavados que se usan en el ensayo, y ser capaz de fijar un reactivo de ensayo a la micropartícula. Ejemplos, de polímeros adecuados son poliésteres, poliéteres, poliolefinas, óxidos de polialquilenos, poliamidas, poliuretanos, polisacáridos, celulosas, y poliisoprenos. El entrecruzamiento resulta útil en muchos polímeros para impartir integridad estructural y rigidez a la micropartícula.

50 Los grupos funcionales para fijación del reactivo de ensayo (por ejemplo, antígeno o anticuerpo) pueden incorporarse en la estructura de polímero mediante medios convencionales. Ejemplos de grupos funcionales

adecuados son grupos amino, grupos amonio, grupos hidroxilos, grupos de ácido carboxílico, y grupos isocianatos. El reactivo de ensayo se une normalmente de manera covalente a la superficie de fase sólida, ya sea de manera directa o indirecta, por ejemplo, con un grupo de unión. Los grupos de unión pueden usarse como un medio para

- 5 aumentar la densidad de grupos reactivos en la superficie de fase sólida y reducir el obstáculo estérico para aumentar el rango y sensibilidad del ensayo, o como un medio para agregar tipos específicos de grupos reactivos a la superficie de fase sólida para ampliar el rango de tipos de reactivos de ensayo que pueden fijarse a la fase sólida. Ejemplos de grupos de unión útiles adecuados comprenden ácido poliaspártico, ácido poliglutámico y poliarginina.
- 10 Las micropartículas de diferentes tipos en un ensayo multiplex pueden distinguirse unas con respecto a las otras, por ejemplo, por tamaño, peso, difusión de luz o absorbancia, o por marcador, por ejemplo, marcador fluorescente.

Cuando el tamaño de micropartícula se usa como un factor de diferenciación (característica distintiva), los anchos del tamaño subvarían y el espacio entre el diámetro medio de subrangos adyacentes se seleccionan para permitir la diferenciación de diferentes tipos de micropartículas mediante citometría de flujo, según será aparente para aquellos capacitados en el uso e instrumentación para citometría de flujo. Normalmente, un subrango para un diámetro medio dado es de alrededor del $\pm 5\%$ CV o menos del diámetro medio, donde CV es el coeficiente de variación y se define como la desviación estándar del diámetro de partícula dividida por el diámetro medio de partícula por 100 por ciento. Los diámetros medios de subrangos para diferentes tipos de partículas se separan de manera general por, al menos, alrededor del 6 % del diámetro medio de uno de los subrangos, por ejemplo, al menos, alrededor del 8 % o del 10 % del diámetro medio de uno de los subrangos.

- 15 La difusión de luz puede usarse, además, para distinguir diferentes tipos de micropartículas. La difusión de luz de ángulo lateral varía con el tamaño de partícula, granularidad, absorbancia y rugosidad superficial, mientras que la difusión de luz de ángulo frontal se ve ligeramente afectada por el tamaño e índice de refracción. La variación de cualquiera de estas cualidades puede dar como resultado diferencias de difusión de luz que pueden servir como un medio para distinguir los diversos grupos.
- 25

Incluso otro ejemplo de un parámetro de diferenciación lo constituye la absorbancia. Cuando se aplica luz a las partículas, la absorbancia de la luz por las partículas se indica en mayor parte por un cambio en la fuerza de la luz de difusión lateral (ángulo lateral) mientras que la fuerza de la luz difundida de manera frontal no se afecta relativamente. Por consiguiente, la diferencia en la absorbancia entre los diversos colorantes de color que se asocian a las partículas se determina por diferencia de observación en la fuerza de la luz que se difunde lateralmente.

- 30 Un amplio conjunto de parámetros y características puede usarse como parámetros de diferenciación para distinguir las partículas de un grupo con respecto a aquellas de otro. Los parámetros de diferenciación pueden surgir a partir del tamaño de partícula, composición, características físicas que afectan la difusión de luz, colorantes fluorescentes que se excitan o colorantes de color que imparten diferentes espectros de emisión y/o características de difusión de las partículas, o a partir de concentraciones diferentes de uno o más colorantes fluorescentes.
- 35

Cuando la característica distinguible es un colorante fluorescente o color, puede recubrirse en la superficie de la micropartícula, integrarse en la micropartícula, o unirse con respecto a las moléculas del material de micropartícula. De este modo, las micropartículas fluorescentes pueden fabricarse mediante la combinación del material de polímero con el colorante fluorescente, o mediante impregnación de la micropartícula con el colorante. Las micropartículas con colorantes ya incorporados y adecuados así para uso en la presente invención se disponen comercialmente a partir de proveedores tales como Spherotech, Inc. (Libertyville, Ill., USA) y Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oreg., USA). Una lista de proveedores de productos de citometría de flujo puede encontrarse en, por ejemplo, el sitio web de molbio.princeton.edu/facs/FCMsites.html.

- 40 Los marcadores pueden ser cualquier sustancia o componente que emite o genera de manera directa o indirecta una señal detectable. En algunas realizaciones, los marcadores son fluorófonos, muchos de los que se informan en la literatura y, de este modo, se conocen por aquellos capacitados en el estado de la técnica, y muchos de los que se disponen comercialmente de manera sencilla. Las fuentes de literatura para fluorófonos incluyen Cardullo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790-8794 (1988); Dexter, J. of Chemical Physics 21: 836- 850 (1953); Hochstrasser et al., Biophysical Chemistry 45: 133-141 (1992); Selvin, Methods in Enzymology 246: 300-334 (1995); Steinberg, Ann. Rev. Biochem., 40: 83- 114 (1971); Stryer, Ann. Rev. Biochem. 47: 819-846 (1978); Wang et al., Tetrahedron Letters 31: 6493-6496 (1990); y Wang et al., Anal. Chem. 67: 1197-1203 (1995).
- 50

- 55 Los siguientes son ejemplos de fluorófonos que pueden usarse como marcadores:
- 60

ácido 4-acetamido-4'isotiocianatostilbena-2,2' disulfónico

acridina

- 65 isotiocianato de acridina

	ácido 5-(2' aminoetil)aminonaftaleno-1-sufónico (EDANS)
5	4-amino-N- [3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato
	N-(4-anilino-1-naftil)maleimida
	antranilamida
10	BODIPY
	Amarillo Brillante
	cumarina
15	7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120)
	7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumarina 151)
20	colorantes de cianina
	cianosina
	4', 6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI)
25	5' 5''-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (Rojo de Bromopirogalol)
	7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)- 4-metilcumarina
30	pentaacetato de dietilentriamina
	ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbena-2,2'-disulfónico
	ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbena-2,2'-disulfónico
35	cloruro de 5-[dimetilamino]-naftalen-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo)
	ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo) benzoico (DABCYL)
40	4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC)
	eosina
	isotiocianato de eosina
45	eritrosina B
	isotiocianato de eritrosina
50	etidio
	5-carboxifluoresceína (FAM)
	5-(4,6-diclorotriazin-2-il)amino-fluoresceína (DTAF)
55	2',7'dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)
	fluoresceína
60	isotiocianato de fluoresceína
	fluorescamina
	IR144
65	IR1446

- isotiocianato de Verde de Malaquita
- 5 4-metilumbeliferona
- orto cresol-ftaleína
- nitrotirosina
- 10 pararosanilina
- Rojo Fenol
- 15 ficoeritrina (incluyendo pero sin limitación a tipos B y R)
- o-ftaldialdehído
- pireno
- 20 butirato de pireno
- succinimidilo 1-pireno butirato
- 25 puntos cuánticos
- Rojo Reactivo 4 (Cibacron™ Rojo Brillante 3B-A)
- 6-carboxi-X-rodamina (ROX)
- 30 6-carboxirrodamina (R6G)
- cloruro de sulfonilo de lisamina y rodamina B rodamina
- rodamina B
- 35 rodamina 123
- isotiocianato de rodamina X
- 40 sulforrodamina B
- sulforrodamina 101
- 45 derivado de cloruro de sulfonilo de sulforrodamina 101 (Texas Red)
- N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA)
- tetrametil rodamina
- 50 isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC)
- riboflavina
- ácido rosólico
- derivados de quelatos de lantánido

55 Un grupo prominente de fluorófonos para inmunoensayos son fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, rodamina B y Texas Red (derivado de cloruro de sulfonilo de sulforrodamina 101). Cualquiera de los fluorófonos en la lista que precede a este párrafo puede usarse en los ensayos que se describen en el presente, ya sea para marcar la micropartícula, o para marcar un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o estreptavidina). Los fluorocromos pueden fijarse mediante enlace covalente convencional, usando grupos funcionales adecuados en los fluorófonos y en la micropartícula o agente de unión. El reconocimiento de tales grupos y las reacciones para formar 60 las uniones serán aparentes de manera sencilla a aquellos capacitados en el estado de la técnica.

Otros marcadores que pueden usarse en lugar de los fluorófonos son marcadores radioactivos y marcadores enzimáticos. Estos se conocen asimismo en el estado de la técnica.

5 Los procedimientos de citometría de flujo e instrumentación se conocen en el estado de la técnica. Las descripciones de la instrumentación y procedimientos pueden encontrarse en, por ejemplo, Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide (2000) Becton, Dickinson, and Company; McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," Methods in Cell Biology 42, Part B (Academic Press, 1994).

10

D. Ejemplos

Este ejemplo ilustra el rendimiento del ensayo multiplex para HBV que se describe en el presente en un conjunto de 46 muestras de plasma a partir de sujetos humanos. Nueve muestras se tomaron a partir de pacientes vacunados contra el HBV, y 37 muestras se tomaron a partir de pacientes que mostraban síntomas de infección por HBV. Las muestras de pacientes se probaron para detectar la presencia de anti-HBs, anti-HBc (total), y anti-HBc (IgM) usando el ensayo BioPlex 2200. Las lecturas se obtuvieron mediante citometría de flujo, que resulta capaz de detectar cada perla de acuerdo con su marca de colorante fluorescente, así como también la presencia de anticuerpo unido a cada perla. Las perlas de HBsAg se unen a todos los anticuerpos (principalmente IgG) que unen HBsAg. Las perlas HBcAg unen todos los anticuerpos (principalmente IgG e IgM) que unen HBcAg. Las perlas anti-IgM unen todos los anticuerpos de IgM, incluyendo aquellos específicos para HBcAg. Todas las perlas son magnéticas. Se prepararon reactivos de perlas a partir de 8 µL de cada uno de: perlas recubiertas de (HBsAg) BioSpecific Ad/Ay (10 mg/ml de material); perlas recubiertas de Steenvoorde HBc 309 (10 mg/ml de material); y perlas recubiertas de Medix anti-µ (10 mg/ml de material) + 2 ml de diluyente de partícula. De manera adicional, 2 perlas de control se incluyeron con cada ensayo: Internal Standard Bead (ISB) (10 mg/ml de material) y Serum Verification Bead (SVB) (10 mg/ml de material). El ISB se diseña para identificar detector de fluctuación(es), y se recubre con un colorante fluorescente único, en este caso, se denomina cadaverina de metilrodamina (TMRC). El SVB se designa para confirmar la presencia de suero o plasma en la muestra y se recubre con anti-FXIII (factor de coagulación XIII).

30 Cada muestra se incubó con reactivo de perla, se retiraron componentes de muestra que no se unen, y las perlas ahora acopladas se lavaron. Se agregó el Reactivo Conjugado 1, que comprende antígenos reporteros biotinilados y anticuerpo reportero biotinilado. Los antígenos reporteros incluyen un dominio para reconocimiento y unión a los anticuerpos de unión a perlas y una molécula detectable, para ya sea detección directa o indirecta. En este caso, los antígenos y anticuerpo reporteros fueron HBs Ad biotinilado (0,6 mg/ml de material), HBs Ay biotinilado (0,58 mg/ml de material), HBc307 biotinilado (0,55 mg/ml de material), y anti-FXIII biotinilado (1,17 mg/ml de material). Las concentraciones en el Reactivo Conjugado 1 fueron 1,25 µg/ml, 1,25 µg/ml, y 0,2 µg/ml, y 0,1 µg/ml, respectivamente. De nuevo, se retiraron los reactivos que no se unen, se lavaron las perlas acopladas, y se agregó el Reactivo Conjugado 2. El Reactivo Conjugado 2 incluyó estreptavidina-PE (1,0 mg/ml de material) a una concentración de 6,0 µg/ml. En este caso, los Reactivos Conjugados incluyeron 1 % de trehalosa y 0,5 % de CHPAS, como reactivos reguladores y de control de fondo. Después del lavado, las muestras se resuspendieron y se detectó la señal mediante citometría de flujo.

Los valores de control y calibración se establecieron según se muestra en la Tabla 1.

45 Tabla1. Lecturas de calibrador de control y corte para ensayo multiplex para HBV

	Anti-HBs	Anti-HBc (total)	Anti-HBc (IgM)
HBs_NC Control negativo para ensayo anti-HBs	102	59	67
HBs_Cal Calibrador de corte para ensayo anti-HBs	381	59	60
HBc_NC Control negativo para ensayos anti-HBc (total) y anti-HBc (IgM)	76	50	83

(continuación)

	Anti-HBs	Anti-HBc (total)	Anti-HBc (IgM)
HBc_Cal Calibrador de corte para ensayo anti-HBc (total)	77	221	99
HBcIgM_Cal Calibrador de corte para ensayo anti- HBc (IgM)	81	6840	2148

5 Una vez que se configuraron los valores de calibración, las muestras de pacientes se probaron. Antes de la muestra, los pacientes se categorizaron como (i) infección aguda; (ii) expuestos a HBV, (iii) susceptibles, (iv) infección pasada, y (v) inmunizados.

Tabla 2. Datos brutos de pacientes para ensayos multiplex para HBV

ID de muestra	Anti-HBs		Anti-HBc (total)		Anti-HBc (IgM)		Estado
	Señal	S/CO	Señal	S/CO	Señal	S/CO	
65255	48	0,1	1031	4,7	12460	5,8	Infección aguda
66311B	59	0,2	564	2,6	982	0,5	Expuesto a HBV
65973	61	0,2	1063	4,8	27401	12,8	Infección aguda
66673	61	0,2	4405	20,0	25543	11,9	Infección aguda
66760	65	0,2	4365	19,8	26763	12,5	Infección aguda
KB72168	65	0,2	4224	19,2	28809	13,4	Infección aguda
U66398	66	0,2	2235	10,1	15284	7,1	Infección aguda
63906	67	0,2	1590	7,2	15204	7,1	Infección aguda
66761	67	0,2	3451	15,7	25968	12,1	Infección aguda
U66545	67	0,2	2068	9,4	15457	7,2	Infección aguda
66073	69	0,2	1592	7,2	27098	12,6	Infección aguda
66311	70	0,2	1387	6,3	15042	7,0	Infección aguda
66392	70	0,2	2042	9,3	19036	8,9	Infección aguda
U66546	71	0,2	2053	9,3	13631	6,3	Infección aguda
U66541	73	0,2	2640	12,0	15758	7,3	Infección aguda
66544	75	0,2	2247	10,2	16657	7,8	Infección aguda
65936	76	0,2	1816	8,2	28248	13,2	Infección aguda

ES 2 711 402 T3

(continuación)

ID de muestra	Anti-HBs		Anti-HBc (total)		Anti-HBc (IgM)		Estado
	Señal	S/CO	Señal	S/CO		Señal	S/CO
U66075	76	0,2	2337	10,6	23647	11,0	Infección aguda
U66458	77	0,2	2477	11,2	23036	10,7	Infección aguda
67492	79	0,2	5843	26,5	28121	13,1	Infección aguda
U66525	80	0,2	8141	36,9	27705	12,9	Infección aguda
66672	81	0,2	5706	25,9	28489	13,3	Infección aguda
1365146-24	83	0,2	84	0,4	1287	0,6	Susceptible
1365146-21	96	0,3	8121	36,8	189	0,1	Expuesto a HBV
1257146-9	125	0,3	13377	60,7	449	0,2	Expuesto a HBV
67403	126	0,3	3183	14,4	27296	12,7	Infección aguda
1257146-5	130	0,3	21928	99,4	178	0,1	Expuesto a HBV
1257146-3	141	0,4	19368	87,8	165	0,1	Expuesto a HBV
1257146-8	142	0,4	23585	107,0	166	0,1	Expuesto a HBV
65579	171	0,4	12411	56,3	2763	1,3	Infección aguda
1365146-48	175	0,5	786	3,6	163	0,1	Expuesto a HBV
U65370	200	0,5	1774	8,0	27122	12,6	Infección aguda
1365146-51	227	0,6	3495	15,9	151	0,1	Expuesto a HBV
65471	279	0,7	1641	7,4	16979	7,9	Infección aguda
65480	685	1,8	60	0,3	89	0,0	Inmunizado
U65501	739	1,9	48	0,2	436	0,2	Inmunizado
67421	823	2,2	55	0,2	52	0,0	Inmunizado
U65499	1834	4,8	131	0,6	175	0,1	Inmunizado
1365146-46	4325	11,4	10223	46,4	261	0,1	Infección pasada
U65498	5234	13,8	50	0,2	113	0,1	Inmunizado
65487	1888	49,6	54	0,2	177	0,1	Inmunizado
67433	2331	61,3	58	0,3	189	0,1	Inmunizado
67439	2381	62,6	54	0,2	257	0,1	Inmunizado

(continuación)

ID de muestra	Anti-HBs		Anti-HBc (total)		Anti-HBc (IgM)		Estado
	Señal	S/CO	Señal	S/CO		Señal	S/CO
1365146-52	2850	74,9	1435	6,5	203	0,1	Infección pasada
65477	2902	76,3	50	0,2	68	0,0	Inmunizado
1365146-45	3048	80,1	3757	17,0	667	0,3	Infección pasada

5 Para la interpretación de datos, el “reactivo” (positivo) se configuró en una señal de calibrador de señal/corte de muestra (S/CO) de $\geq 1,0$, mientras que el “no reactivo” (negativo) se configuró a una señal de calibrador S/CO de muestra de $\leq 1,0$. La tabla 3 muestra la interpretación de los resultados brutos usando los puntajes S/CO anteriores.

Tabla 3. Resultados procesados para ensayo multiplex para HBV

ID de muestra	Anti-HBs	Anti-HBc (total)	Anti-HBc (IgM)	Interpretación
65255	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66311B	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
65973	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66673	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66760	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
KB72168	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
U66398	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
63906	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66761	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
U66545	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66073	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66311	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66392	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
U66546	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
U66541	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66544	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
65936	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
U66075	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
U66458	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda

(continuación)

ID de muestra	Anti-HBs	Anti-HBc (total)	Anti-HBc (IgM)	Interpretación
67492	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
U66525	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
66672	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
1365146-24	No reactivo	No reactivo	No reactivo	Susceptible
1365146-21	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
1257146-9	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
67403	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
1257146-5	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
1257146-3	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
1257146-8	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
65579	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
1365146-48	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
U65370	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
1365146-51	No reactivo	Reactivo	No reactivo	Expuesto a HBV
65471	No reactivo	Reactivo	Reactivo	Infección aguda
65480	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
U65501	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
67421	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
U65499	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
1365146-46	Reactivo	Reactivo	No reactivo	Infección pasada
U65498	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
65487	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
67433	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
67439	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
1365146-52	Reactivo	Reactivo	No reactivo	Infección pasada
65477	Reactivo	No reactivo	No reactivo	Inmunizado
1365146-45	Reactivo	Reactivo	No reactivo	Infección pasada

Los ejemplos anteriores se proporcionan para ilustrar la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit que comprende:
- (a) un primer receptáculo que comprende:
 - 10 (i) perlas que se conjugan con antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg) de humano y marcador detectable (i),
 - (ii) perlas que se conjugan con antígeno de núcleo de Hepatitis B (HBcAg) de humano y marcador detectable (ii), y
 - 15 (iii) perlas que se conjugan con un anticuerpo específico para IgM (anti-IgM) de humano y marcador detectable (iii);
 - (b) un segundo receptáculo que comprende
 - 20 (i) HBsAg biotinilado, y
 - (ii) HBcAg biotinilado; y
 - (c) un tercer receptáculo que comprende estreptavidina que se conjuga con un marcador detectable (iv).
- 25 2. El kit de la reivindicación 1, que comprende además
- (i) reactivo de lavado; y/o
 - 30 (ii) un receptáculo que comprende un control de calibración.
3. El kit de las reivindicaciones 1 o 2, en el que los marcadores detectables (i), (ii), y (iii) son combinaciones distintivas de fluorófonos.
- 35 4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el marcador detectable (iv) se selecciona a partir de ficoeritrina e isotiocianato de fluoresceína.
5. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las perlas (i), (ii), y (iii) responden magnéticamente.
- 40 6. Un ensayo multiplex para procesamiento de una muestra biológica a partir de un sujeto humano y/o determinación del estado de infección por Hepatitis B del sujeto, comprendiendo el procedimiento:
- de (a) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de perlas en un receptáculo, en el que la mezcla de perlas comprende:
- 45 (i) perlas que se conjugan con antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg) de humano y marcador detectable (i),
 - (ii) perlas que se conjugan con antígeno de núcleo de Hepatitis B (HBcAg) de humano y marcador detectable (ii), y
 - 50 (iii) perlas que se conjugan con un anticuerpo específico para IgM (anti-IgM) de humano y marcador detectable (iii);
- (b) retirar componentes que no se unen a perlas a partir del receptáculo;
- 55 (c) poner en contacto la mezcla de perlas con reactivo conjugado 1, en el que el reactivo conjugado 1 comprende:
 - 60 (i) HBsAg biotinilado, y
 - (ii) HBcAg biotinilado;
- (d) retirar componentes que no se unen a perlas;

- (e) poner en contacto la mezcla de perlas con reactivo conjugado 2, en el que el reactivo conjugado 2 comprende estreptavidina que se conjuga con el marcador detectable (iv);
- 5 (f) retirar componentes que no se unen a perlas; y
- (g) determinar mediante citometría de flujo un resultado positivo o negativo para marcador detectable (iv) en perlas que son también positivas para cada uno de los marcadores detectables (i), (ii), o (iii), procesando así la muestra biológica a partir del sujeto humano y/o determinando el estado de infección por Hepatitis B del sujeto.
- 10
7. El ensayo de la reivindicación 6, en el que el positivo y negativo se determinan mediante comparación con respecto a un control de calibración, positivo se define como más alto con respecto al control de calibración, y negativo se define como más bajo con respecto al control de calibración.
- 15
8. El ensayo de la reivindicación 6 o 7, que comprende además
- (a) determinar que el sujeto sufre de infección aguda por Hepatitis B cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (iii); y/o
- 20
- (b) determinar que el sujeto ha sido inmunizado contra la infección por Hepatitis B cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (i), pero no en perlas (ii) o (iii); y/o
- (c) determinar que el sujeto ha si expuesto a Hepatitis B cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (ii) pero no en perlas (i) o (iii).
- 25
- (d) determinar que el sujeto ha tenido una infección por Hepatitis B en el pasado cuando el marcador detectable (iv) resulta positivo en perlas (i) y (ii) pero no en perlas (iii).
- 30
9. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que los marcadores detectables (i), (ii), y (iii) son combinaciones distintivas de fluorófonos.
10. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que el marcador detectable (iv) se selecciona a partir de ficoeritrina e isotiocianato de fluoresceína.
- 35
11. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que las perlas (i), (ii), y (iii) responden magnéticamente.
12. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que la etapa (b) comprende lavar las perlas.
- 40
13. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12, en el que la etapa (d) comprende lavar las perlas
14. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-13, en el que la etapa (f) comprende lavar las perlas
- 45
15. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-14, en el que la muestra biológica es sangre, un componente de la sangre, o sangre procesada.

Figura 1

