



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 304 189**

⑫ Número de solicitud: 200401268

⑬ Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **26.05.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2008**

Fecha de la concesión: **22.07.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **12.08.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.08.2009

⑲ Titular/es: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, 5
30003 Murcia, ES

⑳ Inventor/es: **Cerón Madrigal, José Joaquín;**
Martínez Subiela, Silvia;
Tecles Vicente, Fernando y
Parra Muñoz, María Dolores

㉑ Agente: **Dávila Baz, Ángel**

㉒ Título: **Procedimiento para determinar proteína C-reactiva en saliva y otros fluidos de distintas especies animales.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para determinar proteína C-reactiva en saliva y otros fluidos de distintas especies animales.

El presente procedimiento permite cuantificar proteína C-reactiva en saliva y otros fluidos de diferentes especies animales (perros, équidos, cerdos) de una forma muy sensible y específica. Se trata de inmunoensayos basados en fluorometría en tiempo retardado, que emplean como anticuerpos de captura anticuerpos biotinilados sobre placas de estreptavidina y anticuerpos marcados con europio como anticuerpos trazadores. Dichos inmunoensayos se pueden emplear para detectar con un alto grado de sensibilidad animales que tengan cualquier problema inflamatorio, y estimar el estado sanitario de las explotaciones ganaderas o de animales destinados a consumo humano.

ES 2 304 189 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar proteína C-reactiva en saliva y otros fluidos de distintas especies animales.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de los análisis clínicos veterinarios. Y en concreto, se refiere a un procedimiento para determinar y cuantificar la proteína C-reactiva, en saliva y otros fluidos de distintas especies animales, tales como perros, cerdos, caballos, etc.

Estado de la técnica

10 La saliva es un fluido biológico segregado en abundante cantidad y a un ritmo relativamente regular por las glándulas salivales. Contiene un cierto número de elementos, algunos de los cuales son comunes a otros fluidos corporales como sangre y orina, y en cantidades suficientes como para considerar su análisis en ensayos biológicos (Lac, 2001).

15 En los últimos años, en medicina humana se han utilizado con éxito ensayos que emplean saliva fundamentalmente para medir inmunoglobulinas (Kugler *et al.* 1992), hormonas esteroideas y no esteroideas (Costigan *et al.* 1988; Lac *et al.* 1993; Kirschbaum y Helhammer 1994), y proteínas de fase aguda (Whitener *et al.* 1994; Pederson *et al.* 1995).

20 En medicina veterinaria, las muestras de saliva han sido utilizadas principalmente para la determinación de cortisol, al representar un método no invasivo y por lo tanto no estresante, que ha permitido numerosos estudios de estrés en animales de granja (Barnett y Hemsworth, 1990) y en perros (Beerda *et al.* 1996, 1998, 2000). Asimismo, la saliva de perro ha sido empleada para medir IgGs (German *et al.* 1998) o para detectar el virus de la rabia (Kasempimolporn *et al.*, 2000).

25 El uso rutinario de muestras de saliva en lugar de las convencionales de suero o plasma supondría numerosas ventajas, entre las cuales destacamos:

- La recolección de muestras de saliva es un método no invasivo y por tanto, menos estresante para el animal que la punción de un vaso sanguíneo.
- El propietario podría recoger la muestra de saliva en su casa, debido a la facilidad que supone tomar una muestra de la misma, lo cual sería muy ventajoso para personas que viven alejadas de centros veterinarios o para animales que no están acostumbrados al transporte.
- En caso de animales agresivos que sólo se dejan manipular por su propietario, se evitaría la sedación de dichos animales.

40 Una respuesta de fase aguda es aquella que se produce en el animal como respuesta a disturbios de la hemostasia causados por infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desórdenes inmunológicos (Kushner *et al.* 1981). Durante el desarrollo de la respuesta de fase aguda, se liberan citoquinas y otros mediadores que desencadenan, entre otros efectos, la variación de las concentraciones de determinadas proteínas presentes en el plasma denominadas Proteínas de Fase Aguda (PFA). En medicina humana y cada vez más en veterinaria, la monitorización de las concentraciones plasmáticas de estas proteínas proporciona una valiosa información en diversos problemas patológicos que cursan con inflamación, pudiendo ser utilizada para el diagnóstico así como para monitorizar la evolución de la enfermedad y evaluar la respuesta a los tratamientos aplicados.

50 Las proteínas que sufren un mayor incremento son diferentes en cada especie, así en bovino el amiloide A sérico y la haptoglobina se consideran las principales proteínas de fase aguda, mientras que en el cerdo predomina la proteína C-reactiva (PCR) y el pig-MAP, y en équidos el amiloide A sérico. En la especie canina la PCR es la PFA más importante. Su análisis ha demostrado ser útil para valorar inflamación aguda en situaciones clínicas y experimentales (Caspi *et al.* 1987; Hayashi *et al.* 2001) y en este sentido, se ha empleado para valorar la severidad del daño inflamatorio en perros con erlichiosis (Rikihisa *et al.* 1994), como indicador de daño de la mucosa gastrointestinal (Otabe *et al.* 2000) o para valorar el estado de perros infectados con *Leishmania infantum* (Martínez-Subiela *et al.* 2002).

55 La detección fluorométrica es una técnica extremadamente sensible, de manera que un compuesto fluorescente puede ser excitado más de 200.000 veces en un segundo y producir aproximadamente el mismo número de fotones emitidos. Los inmunoensayos basados en fluorometría en tiempo retardado constituyen por tanto una tecnología no radiactiva de elevada sensibilidad, exactitud y amplio rango de ensayo (Lövgren y Pettersson, 2000). En ellos antígenos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (Eriksson *et al.* 2000) son marcados con quelatos de lantánidos (europio, samario, terbio), que bien desarrollan fluorescencia gracias a una solución intensificadora o bien presentan fluorescencia intrínseca estable, sin la necesidad de ninguna intensificación (Pettersson *et al.* 2000). Dichos inmunoensayos están proporcionando métodos rápidos y ultrasensibles para la cuantificación de numerosas hormonas animales y humanas (Fiet *et al.* 2000; Parra *et al.* 2004), para la detección de drogas (Kimura *et al.* 2000), anticuerpos específicos (Aggerbeck *et al.* 1996) y marcadores tumorales (Soukka *et al.* 2001). De igual manera esta tecnología ha permitido la cuantificación de la haptoglobina bovina (McNair *et al.* 1997) y de la proteína C-reactiva humana (Tarkkinen *et al.* 2002).

Hasta el momento no hay ningún estudio sobre proteínas de fase aguda en saliva de perros. En medicina veterinaria únicamente se ha medido una proteína de fase aguda, la haptoglobina, en saliva de cerdos (Hiss *et al.* 2003), si bien dichos autores no encontraron una buena correlación entre los valores de la proteína en suero y saliva y por tanto descartaron su posible uso con valor diagnóstico. Otro estudio reciente (Moya *et al.* 2003) mostró que mediante un ELISA comercial ni la PCR ni el amiloide A sérico podían ser detectados en saliva porcina y un intento de medir la PCR canina en saliva mediante otro ELISA comercial también falló. Por tanto, actualmente no existen métodos de análisis suficientemente sensibles para la determinación de proteína C- reactiva en muestras de saliva.

Descripción de la invención

Actualmente no existen métodos que permitan la cuantificación de la proteína C- reactiva (PCR) en la saliva de animales, debido a que su concentración en saliva es tan pequeña que no puede ser detectada por métodos convencionales como MA o ELISA. La presente invención, se basa en el desarrollo de fluoroinmunoensayos en tiempo retardado, que permiten determinar proteína C-reativa en muestras de saliva de diferentes especies animales, al ser la fluorometría una técnica extremadamente sensible.

Para desarrollar el ensayo es necesario obtener los siguientes materiales:

- un quelato de europio.
- anticuerpos específicos frente a la proteína en cuestión (anti-PCR canina, anti- PCR porcina, etc.). Pueden ser anticuerpos frente a la proteína humana pero con reactividad cruzada para la proteína animal. Posteriormente será necesario biotinilar una parte de los anticuerpos al igual que otra parte será marcada con el quelato de europio.
- PCR pura que se obtiene a partir de sueros animales con elevada concentración de la misma. La proteína purificada se emplea como estándar para calibrar los ensayos.
- placas de microtitulación recubiertas de estreptavidina.
- solución intensificadora de la fluorescencia (glicina-NaOH 50 mM (pH 10), NaSCN 1,75 M, Na₂CO₃ 5 mM, NaCl 1 M, glicerol 5% y 1-propanol 20%).

Para recoger las muestras de saliva se utilizan tubos del tipo Salivette® con una ligera modificación que consiste en la sustitución del algodón prensado por una esponja porosa, ya que el primero es demasiado absorbente e impide la liberación de la saliva. La esponja se introduce en la boca del animal en la zona del carrillo durante al menos 1 minuto, luego se coloca en el Salivette® y se centrifuga para obtener la saliva. Finalmente la muestra es almacenada en un tubo eppendorf a una temperatura de -20°C.

Algunas muestras de saliva pueden requerir una dilución previa a su análisis. Por otro lado, muestras de sangre entera, suero, plasma e incluso efusiones, con un contenido mucho más elevado en PCR, también pueden ser medidas con estos inmunoensayos siempre y cuando sean convenientemente diluidas.

Todos los inmunoensayos que emplean fluorometría en tiempo retardado se pueden dividir en dos grandes grupos: *competitivos*, basados en el marcaje de antígenos y *no competitivos (tipo sándwich)*, basados en el marcaje de anticuerpos en lugar de antígenos. En un principio se van a desarrollar inmunoensayos tipo no competitivo, ya que estos pueden ser varias órdenes de magnitud más sensibles que los ensayos competitivos y se caracterizan por una especificidad elevada, optimización de ensayo simple y rango de ensayo amplio. Los ensayos de este tipo requieren dos tipos de anticuerpos:

- Un anticuerpo de captura o primario, que en nuestro caso será el anticuerpo biotinilado, el cual a su vez se une a la estreptavidina que recubre las placas de microtitulación. El motivo de emplear este sistema en lugar de anticuerpos sin biotinilar directamente sobre la placa es que, en general, se necesita más cantidad de anticuerpo para fijar directamente. Así normalmente se emplean 1000 ng para fijar directamente y 200 ng biotinilados. Teniendo en cuenta que los anticuerpos normalmente son comprados, otra ventaja de este sistema es que es más económico.
- Un anticuerpo trazador o secundario, que es el anticuerpo marcado con europio, que permite detectar la proteína que se ha unido previamente al anticuerpo primario.

Por tanto, el desarrollo de los inmunoensayos requiere los siguientes pasos:

1. Biotinilación de anticuerpos primarios o de captura

Los anticuerpos a biotinilar no pueden contener grupos azida ni aminas, por tanto normalmente el tampón en el que van diluidos se cambia a NaCl 0,9% empleando para ello columnas NAPTM-10 que contienen Sephadex® G-25 (Pharmacia Biotech). El funcionamiento de las columnas es el siguiente:

ES 2 304 189 B1

Se quitan los tapones de ambos extremos eliminando el líquido de su interior. A continuación se sitúa la columna sobre un soporte estable y se equilibra el gel con 15 ml del nuevo tampón, o lo que es lo mismo, se rellena la columna en tres ocasiones. Se deja eluir todo el tampón y seguidamente se añade 1 ml del anticuerpo con tampón desconocido. Se deja que llene el gel, se coloca un tubo eppendorf debajo del orificio de salida de la columna y finalmente, se eluye la muestra purificada con 1,5 ml del NaCl 0,9%, recogiendo los anticuerpos con el nuevo tampón.

La reacción de biotilación requiere los siguientes elementos:

- anticuerpos en un tampón adecuado, como el NaCl 0,9%.
- tampón carbonato 50 mM (pH 9,8)
- Biotin-isotiocianato (BITC) 10 mM diluido en dimetilformamida, 80 veces en exceso.

La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas, tras las cuales el exceso de BITC es removido haciendo pasar la mezcla a través de una columna NAP-10 de igual forma a la descrita anteriormente sólo que en lugar de emplear como tampón NaCl 0,9%, se utiliza TSA (Tris, NaCl y NaN_3) pH 7. Los 1,5 ml resultantes de esta filtración son divididos en dos alícuotas de forma que 1 ml se introduce en una nueva columna NAPTM-10 y el 0,5 ml restante se pasa a una columna NAPTM-5 (Pharmacia Biotech). El funcionamiento de esta columna es muy similar al de la NAPTM-10. En primer lugar se retira el tapón de la parte superior de la columna y se elimina el exceso de líquido. A continuación se quita el tapón de la parte inferior y se sitúa la columna sobre un soporte estable. Seguidamente se equilibra el gel con aproximadamente 10 ml del tampón requerido (TSA), lo que corresponde a tres llenados completos de la columna. Se deja que el tampón se equilibre con el gel y a continuación se añade 0,5 ml de la solución de anticuerpos dejando que también reaccione con el gel. Entonces se coloca un tubo eppendorf debajo de la columna y se eluye la muestra purificada con 1 ml del nuevo tampón. Finalmente los 1,5 ml resultantes de la segunda NAPTM-10 y el 1 ml obtenido con la NAPTM-5 son mezclados y se añade albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% a la solución así formada, para evitar la agregación de los anticuerpos.

2. Marcaje de anticuerpos secundarios o trazadores con europio (Eu)

El marcaje requiere que el anticuerpo esté en un tampón que no contenga grupos amina o azida, por lo tanto, al igual que con la biotilación es necesario cambiar el tampón, empleando para ello una columna NAPTM-10 cuyo funcionamiento ya ha sido explicado anteriormente. El nuevo tampón utilizado es de nuevo el NaCl 0,9%.

Además hay que preparar una solución de quelato de concentración conocida, para lo cual se siguen los pasos descritos a continuación:

En primer lugar, se pesa alrededor de 1 mg del quelato de europio y se disuelve en agua purificada agitando en vórtice. A continuación, se filtra con un filtro de 0,22 μm en un tubo eppendorf y se agita en vórtice. Seguidamente se hacen dos tipos de diluciones:

- 1:100, mezclando 10 μl del quelato con 990 μl de solución intensificadora*
- 1:200, mezclando 5 μl del quelato con 995 μl de solución intensificadora*

* La solución intensificadora libera el europio del quelato y hace que podamos medir su fluorescencia en cps.

Estas diluciones se emplean a su vez para realizar dos series de diluciones seriadas 1:10, de manera que 100 μl de las primeras diluciones se mezclan con 900 μl de solución intensificadora, se agitan y 100 μl de las nuevas diluciones se mezclan con otros 900 μl de solución intensificadora y así sucesivamente hasta obtener 10 diluciones en cada serie.

A continuación, se ponen 200 μl de las muestras más diluidas por triplicado en placas vacías (Maxi plates), se agitan durante 30 minutos y se lee la fluorescencia en un fluorímetro. Los resultados son transferidos al programa estadístico Microsoft Excel para calcular la concentración de europio, teniendo en cuenta que 1.000.000 de cps corresponden a una concentración de europio 1 nM, 100.000 cps a 0,1 y 1.000 a 0,01. La ecuación que relaciona la señal de fluorescencia con la concentración de europio en nM es la siguiente: $y = 1.000.000x$, donde x es la concentración de Eu (nM) e y es la fluorescencia en cps. Tras multiplicar por el factor de dilución cada uno de los valores de cps, se toman aquellas concentraciones finales de europio más parecidas entre sí y se calcula su media.

Para el marcaje necesitamos un volumen final de 1 ml y quelato 100 veces en exceso molar, de tal manera que son necesarias las siguientes operaciones:

A) Para saber el volumen en μl de quelato a emplear se tiene en cuenta lo siguiente: 1 mg de anticuerpo, suponiendo que sean todos IgGs (Inmunoglobulina G), tendrá los siguientes moles:

$$\frac{X \text{ mg de proteína} \times 1.000.000}{160.000} = Y \text{ nmol IgG}$$

(160.000 g/mol es el peso molecular de la IgG).

Como se quiere que el quelato esté en exceso molar del 100% se tendrá que añadir: $100 \times Y \text{ nmol} = Z \text{ nmol}$ de quelato de europio. El volumen de quelato se obtiene tras aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{Z \text{ nmol}}{\text{*mmol/L quelato de Eu}} = \text{ } \mu\text{l}$$

B) El pH de la solución se ajusta con tampón carbonato 50 mM (pH 9,8) 1:10 (v/v)

C) Finalmente, para completar el mililitro fijado se añade agua purificada.

El mililitro formado por estas sustancias se incuba durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se filtra con un filtro de 0,22 μm de diámetro de poro quedando el anticuerpo marcado listo para ser purificado mediante FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) usando una columna de alta resolución Superdex 200 que separa las moléculas en función de su peso molecular.

Las fracciones que contienen el anticuerpo marcado más puro son las elegidas para formar un conjunto o pool, que es filtrado con un filtro de 0,22 μm de diámetro de poro. La concentración de proteínas o anticuerpo de este pool es determinada por absorbancia a 280 nm y la técnica Bradford de BioRad.

Para dar por concluido el marcaje se añade DTPA-BSA pura al 7,5% hasta una concentración final del 0,1% y se almacena el anticuerpo marcado a 4°C.

Una forma de anticipar si el marcaje ha sido eficiente, es calcular el grado de anticuerpo marcado. Lo ideal es que al menos haya 4 europios por anticuerpo y un máximo de 10. Lo primero que se hace son dos diluciones:

- 1:500, mezclando 5 μl del anticuerpo marcado con 2.500 μl de solución intensificadora

- 1:5.000 mezclando 100 μl de la dilución 1:500 con 900 μl de solución intensificadora.

Se añaden 200 μl de ambas diluciones sobre pocillos vacíos por triplicado, a continuación se agita durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lee la fluorescencia en un fluorímetro. Si salen cuentas superiores a un millón es necesario diluir más el anticuerpo y por tanto realizar diluciones 1:10.000 y 1:100.000. Teniendo en cuenta el factor de dilución y que un millón de cps equivale a una concentración de Eu de 1 nM se calcula la concentración de europio de las muestras. El grado de marcaje se calcula dividiendo la concentración de Eu por la concentración de IgGs.

3. Purificación de la proteína C reactiva (PCR)

Para la purificación de la proteína C reactiva es necesario obtener sueros de animales con inflamación, por tanto puede utilizarse el suero de animales que acaban de sufrir una cirugía.

PCR canina

Para la purificación de PCR canina es necesaria una columna de afinidad (agarosa) unida a fosforiletanolamina a través de enlace epoxi (Onishi *et al.* 1994, J. Vet. Med. Sci. 56, 417-419).

Una vez equilibrada la columna con tampón 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 0,02% NaN_3 , pH 8), se añade el suero de fase aguda. Seguidamente se lava con tampón de equilibrio y a continuación se pone el tampón de elución (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,02% NaN_3 , pH 8) recogiendo fracciones de aproximadamente 1 ml. Se mide la absorbancia a 280 nm de todas las fracciones y aquellas que presentan un mayor valor de absorbancia se juntan en un pool o conjunto. La pureza de la proteína se valora por SDS-PAGE.

PCR porcina

La purificación de PCR porcina requiere cromatografía de afinidad (Sefarosa 4B unida a colaminfosfato) seguida de cromatografía de intercambio aniónico (DEAE sefarosa 4B) (Burger *et al.* 1998, J. Vet. Med. B 45, 1-6).

PCR equina

La PCR puede ser purificada a partir de sueros equinos mediante cromatografía de afinidad, seguida de cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel (Takiguchi *et al.* 1990, Am. J. Vet. Res. 51, 1215-1220).

4. Realización del inmunoensayo

En primer lugar se pipetea los anticuerpos anti-PCR biotinilados en placas recubiertas de estreptavidina y se incuban durante 45 minutos a temperatura ambiente y con agitación lenta. Seguidamente, se lavan las tiras con tampón de lavado (tampón Tris-HCl 5 mM pH 7,75, que contiene NaCl 0,9% y Tween 20 0,05%). Las tiras así procesadas pueden ser almacenadas durante una semana. A continuación se añaden las muestras sin diluir o diluciones de las mismas en tampón de ensayo (tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,75 conteniendo NaCl 0,9%, NaN_3 0,05%, BSA 0,5%, Tween 40 0,01%, γ -globulina bovina 0,05%, ácido dietilenetriaminapentacético 20 μM y Rojo Cereza 20 $\mu\text{g/ml}$). Se incuban durante 45 minutos en agitación continua y después de un segundo lavado, se aplican los anticuerpos anti-PCR marcados con europio. Se vuelve a incuban durante 45 minutos y posteriormente se realiza otro lavado. Finalmente, se añade la solución intensificadora (glicina-NaOH 50 mM (pH 10), NaSCN 1,75 M, Na_2CO_3 5 mM, NaCl 1 M, glicerol 5% y 1-propanol 20%) y se incuban durante unos minutos. La fluorescencia desarrollada, proporcional a la cantidad de PCR presente en la muestra, es medida mediante un fluorímetro. Aunque conviene leer la placa nada más acabar la incubación, la fluorescencia es estable durante horas.

Realización de la invención

Para desarrollar el ensayo son necesarios los siguientes pasos:

1. Biotinilación de anticuerpos primarios o de captura

Se procedió a biotinilar 1 mg de anticuerpo policlonal anti-PCR de perro producido en cabra.

En primer lugar, teniendo en cuenta que el marcaje no puede contener grupos azida, se cambió el tampón de los anticuerpos a NaCl 0,9% empleando para ello columnas NAPTM-10 que contienen Sephadex[®] G-25 (Pharmacia Biotech). El funcionamiento de las columnas ya ha sido explicado anteriormente.

La concentración inicial de los anticuerpos era de 1,64 mg/ml, como tras su paso por la columna el volumen final es de 1,5 ml, la concentración de los anticuerpos en solución pasa a ser de 1,093 mg/ml. Por otra parte, hay que tener en cuenta que el paso por la columna implica pérdidas de anticuerpo del 4%, por lo que la concentración real y final de los anticuerpos es de 1,049 mg/ml. De esta manera como queríamos biotinilar 1 mg de anticuerpo era necesario utilizar 953 μl de la solución de anticuerpo, pero teniendo en cuenta que la biotinilación requiere un volumen final de 1 ml fue necesario disminuir el volumen de la solución de anticuerpos mediante un sistema de evaporación por vacío (centrífuga HETOVAC[®] modelo VR-1), ya que para la reacción de biotinilación también son necesarios tampón carbonato 50 mM (pH 9,8) (10% p/v) y biotín-isotiocianato (BITC) 80 veces en exceso disuelto en dimetilformamida. Por lo tanto la reacción final constó de los siguientes elementos:

- 680 μl de la solución de anticuerpos concentrada.

- 100 μl de tampón carbonato 50 mM (pH 9,8)

- 50 μl de BITC 10 mM.

- 170 μl de agua mQ.

Dicha reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas, tras las cuales el exceso de BITC fue removido haciendo pasar la mezcla a través de una columna NAP-10 empleando como tampón TSA pH 7. Los 1,5 ml resultantes de esta filtración fueron divididos en dos alícuotas de forma que 1 ml se introdujo en una nueva columna NAP-10 y el 0,5 ml restante se pasó a una columna NAP-5. Finalmente los 1,5 ml resultantes de la segunda NAP-10 y el 1 ml obtenido con la NAP-5 fueron mezclados y se añadió albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% a la solución así formada para evitar la agregación de los anticuerpos.

2. Marcaje de anticuerpos secundarios o trazadores

Anticuerpos policlonales anti-PCR canina fueron marcados con el quelato de europio 4-[2-(4-isotiocianatofenil)etnil]-2,6-bis[[N,N-bis(carboximetil)amino]metil] piridina, conocido como ITC-TEKES, que fue proporcionado por Innotrak Diagnostics Oy (Turku, Finland).

Al igual que sucedió con la biotinilación, fue necesario cambiar el tampón del anticuerpo, empleando para ello una columna NAPTM-10. El nuevo tampón fue también NaCl 0,9%.

ES 2 304 189 B1

A continuación se pesó alrededor de 1 mg de quelato y se disolvió en 200 μ l de agua mQ agitando en vórtice. Luego, con una jeringuilla de 1 ml se filtró con un filtro de 0,22 μ m (Millex-GV, Millipore) en un tubo eppendorf y se agitó en vórtice. Seguidamente se hicieron dos tipos de diluciones:

- 1:100, mezclando 10 μ l del quelato con 990 μ l de solución intensificadora.
- 1:200, mezclando 5 μ l del quelato con 995 μ l de solución intensificadora.

Estas diluciones se emplearon a su vez para realizar dos series de diluciones seriadas 1:10 (10 diluciones en cada serie).

A continuación, se pusieron 200 μ l de las muestras más diluidas por triplicado en placas vacías (Maxi plates), se agitaron durante 30 minutos y se leyó la fluorescencia en un fluorímetro. Los resultados fueron transferidos al programa estadístico Microsoft Excel para calcular la concentración de europio teniendo en cuenta que 1.000.000 de cps corresponden a una concentración de europio 1 nM, 100.000 cps a 0,1 nM y 1.000 a 0,01 nM. La ecuación que relaciona la señal de fluorescencia con la concentración de europio en nM es la siguiente: $y = 1.000.000x$, donde X es la concentración de Eu (nM) e Y es la fluorescencia en cps. Tras multiplicar por el factor de dilución cada uno de los valores de cps, se tomaron aquellas concentraciones finales de europio más parecidas entre sí (tabla 1) y se calculó su media. Ésta fue de 4141290 nM o lo que es igual de 4,14 mM o 4141,29 nmol/ml.

TABLA 1

DILUCIÓN	CPS	Eu nM
1,00E+10	4517	45170000
1,00E+09	20462	20462000
1,00E+08	70066	7006600
1,00E+07	440996	4409960
1,00E+06	3662267	3662267
2,00E+10	12284	245680000
2,00E+09	12395	24790000
2,00E+08	31074	6214800
2,00E+07	220997	4419940

Para el marcaje se va a necesitar un volumen final de 1 ml, tampón carbonato 1:10 (v/v) y quelato 100 veces en exceso molar, de tal manera que fueron necesarias las siguientes operaciones:

A. Como se quería marcar 1 mg de anticuerpos con concentración 1,049 mg/ml, se necesitaba un volumen de 953 μ l de la solución de anticuerpos. Este volumen es excesivo ya que al añadir el tampón se superaría el ml preestablecido, por tanto hubo que disminuir el volumen mediante el sistema HETOVAC. El volumen final obtenido fue de 720 μ l.

B. Por otra parte si la concentración de quelato diluido era de 4,14 mM* para saber el volumen necesario de quelato que se debía añadir, se tuvo en cuenta lo siguiente: 1 mg de anticuerpo, suponiendo que sean todos IgGs, tendrá los siguientes moles:

$$\frac{X \text{ mg de proteína} \times 1000000}{160000} = Y \text{ nmol IgG} = 6,25$$

(160.000 g/mol es el peso molecular de la IgG).

ES 2 304 189 B1

Como se quiere que el quelato esté en exceso molar del 100% se tendrá que añadir: $100 \times Y \text{ nmol} = Z \text{ nmol}$ de quelato de europio = 625

$$\frac{Z \text{ nmol}}{* \text{mmol/L quelato de Eu}} = 625/4,14 = 150,9 \mu\text{l}$$

C. El pH de la solución de IgG se ajustó con tampón carbonato 50 mM (pH 9,8) 1:10 (v/v) Por tanto se emplearon 100 μl del mismo.

D. Finalmente, para completar el mililitro fijado se añadieron 29 μl de agua mQ.

El mililitro formado por estas cuatro sustancias fue incubado durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se filtró con un filtro de 0,22 μm de diámetro de poro (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda) quedando el anticuerpo marcado listo para ser purificado mediante FPLC usando una columna de alta resolución Superdex 200 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

El primer pico de elución que viene precedido de una pequeña meseta corresponde al anticuerpo marcado, que al tratarse de un anticuerpo policlonal puede que contenga alguna impureza responsable de esta imagen peculiar. Los dos picos restantes corresponden a europio libre que forma agregados de gran tamaño. Las fracciones que contenían el anticuerpo marcado más puro, en teoría las de la parte superior del pico, fueron analizadas en el siguiente ensayo:

Sobre placas recubiertas de estreptavidina se añadieron 300 ng/pocillo de anticuerpo policlonal anti-PCR canina biotinilados. Se incubó durante 45 minutos en agitación continua, se lavó 4 veces y se añadieron 200 ng por pocillo de PCR canina que se incubaron durante 45 minutos más. Posteriormente se volvió a lavar y se añadieron diluciones 1:10.000 y 1:100 de cada una de las fracciones escogidas por duplicado. Se incubó durante 45 minutos, se lavó de nuevo, se añadió la solución intensificadora con la que las placas estuvieron en agitación continua durante 20 minutos y finalmente se leyó la fluorescencia en un fluorímetro. Hay que decir que algunos pocillos sólo recibieron las fracciones con anticuerpo marcado pero no los anticuerpos biotinilados ni la PCR pura. En ambos pasos se añadió simplemente tampón de ensayo con objeto de comprobar el ruido de fondo residual de las diferentes fracciones.

Aquellas fracciones cuyas cuentas de fluorescencia fueron más elevadas y cuyo ruido de fondo fue más bajo (menor número de cps) fueron las elegidas para formar un pool que fue filtrado con un filtro de 0,22 μm de diámetro de poro (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland). La concentración de proteínas o anticuerpo de este pool fue determinada por Bradford. Finalmente se añadió DTPA-BSA pura al 7,5% hasta una concentración final del 0,1% y se almacenó el anticuerpo marcado a 4°C.

Para calcular el grado de anticuerpo marcado se hicieron dos diluciones:

- 1:500, mezclando 5 μl del anticuerpo marcado con 2.500 μl de solución intensificadora.
- 1:5.000 mezclando 100 μl de la dilución 1:500 con 900 μl de solución intensificadora.

Se añadieron 200 μl de ambas diluciones sobre pocillos vacíos por triplicado, a continuación se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se leyó la fluorescencia en un fluorímetro. Como salieron cuentas superiores a un millón (tabla 2) fue necesario diluir más el anticuerpo y por tanto se realizaron diluciones 1:10.000 y 1:100.000. Teniendo en cuenta el factor de dilución y que un millón de cps equivale a una concentración de Eu de 1 nM, se calculó la concentración de europio de las muestras y para el cálculo del grado de marcaje se empleó la media de concentración aportada por las dos últimas diluciones, que fue de 11.097,3 nM.

TABLA 2

MUESTRA	CPS	%CV	Eu nM
1:500	7607130	0,3	3.809,8
1:500	7648880		
1:500	7603060		
media	7619690		
1:5.000	1938020	0,6	9.756,7
1:5.000	1961750		
1:5.000	1954270		
media	1951347		

1:10.000	1102560	1,0	10.927,7
1:10.000	1080760		
1:10.000	1095010		
media	1092777		
1:100.000	113058	0,5	11.266,9
1:100.000	112058		
1:100.000	112891		
media	112669		

El grado de marcaje se calcula dividiendo la concentración de Eu por la de IgGs. La concentración de los anticuerpos marcados fue de 0,2552 mg/ml. Para pasar esta concentración a moles es necesario dividir por el peso molecular:

$$0,2552/160.000 = 1.595 \times 10^{-9} \text{ moles} = 1.595 \text{ nM}$$

Por todo esto, el grado de marcaje quedaría como $11.097,3/1.595 = 6,9$.

3. Purificación de PCR

Se procede al acoplamiento de fosforiletanolamina a agarosa a través de enlace epoxi.

En primer lugar, se pesa 1 g de agarosa epoxi activada que se deja en un vaso de plástico con 45 ml de agua destilada toda la noche a 4°C, tapado con parafilm.

A la mañana siguiente, se pasa a una columna del tipo NAP10 vacía y se lava con 55 ml más de agua y a continuación con 50 ml de tampón de acoplamiento (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 11). Seguidamente, la agarosa se cambia a un matraz, lavando la columna con 20 ml de tampón de acoplamiento. Una vez se deposita la resina en el fondo del matraz, se retira el máximo de tampón y se añaden 0,1 g de fosforiletanolamina disueltos en 5 ml de tampón de acoplamiento. Como la relación gel:ligando debe ser 1:2 y 1 g de gel se expande a 3 ml, la fosforiletanolamina debe ir disuelta en un volumen máximo de 6 ml. El matraz se tapa con parafilm y se deja en un incubador a 30°C con agitación continua a 280 r.p.m. durante 22 horas.

Al día siguiente se vuelve a montar la columna y se añade la resina lavando con unos 75 ml de tampón de acoplamiento. Seguidamente se añaden 5 ml de etanolamina 1 M pH 9,4 para bloquear los grupos activos restantes y se deja toda la noche en agitación continua en cámara fría a 4°C. A partir de este momento todas las operaciones son realizadas a esta temperatura.

El cuarto día se deja eluir la etanolamina de la columna, se lava con 20 ml de tampón de acoplamiento y se comienza a regenerar la columna con lavados alternos de tampón acetato 0,1 M, NaCl 1 M, pH 4 y tampón Tris-HCl 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8. Se llevan a cabo tres ciclos de lavado de 20 ml con cada uno de los tampones. Posteriormente, se lava con 50 ml de agua destilada y a continuación con 20 ml de tampón de equilibrio (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,02% NaN₃, pH 8), se deja tres horas con unos 5 ml de este tampón y se vuelve a lavar con 50 ml del mismo, dejándolo toda la noche con el tampón.

El quinto día se lava con 20 ml de tampón de equilibrio, se deja la columna prácticamente seca y se añaden 3 ml de suero canino de fase aguda diluidos en 2 ml de tampón de equilibrio. Esta solución se hace pasar 3 veces por la columna, de manera que el eluido que va saliendo de la misma por gravedad, se va recogiendo en un tubo de Falcon y se vuelve a depositar en la columna. Seguidamente, se lava la columna con 40 ml de tampón de equilibrio empleando una bomba de infusión con un flujo de 0,4 ml/minuto (Econo pump), ajustada a un colector de fracciones (Biorad Model 2110 Fraction Colector), de modo que se recogen 40 fracciones de aproximadamente 1 ml. A continuación se pone el tampón de elución (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,02% NaN₃, pH 8) y se lava con 20 ml recogiendo fracciones de menor volumen.

Las fracciones que proporcionan un mayor valor de absorbancia a 280 nm se juntan en un pool o conjunto y la pureza de la proteína se valora por SDS-PAGE.

4. Realización del fluoroinmunoensayo

En primer lugar 300 ng por pocillo de anticuerpos policlonales anti-PCR canina biotinilados fueron pipeteados en placas recubiertas de estreptavidina e incubados durante 45 minutos a temperatura ambiente y con agitación lenta empleando para ello un agitador de placas DELFIA (PerkinElmer Lifesciences; Turku, Finlandia). Seguidamente las

tiras fueron lavadas 4 veces con tampón de lavado (tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7,75, conteniendo NaCl 0,9% y Tween 20 0,05%) usando el lavador de placas DELFIA (PerkinElmer Lifesciences; Turku, Finlandia). Las tiras así procesadas pueden ser almacenadas durante una semana. A continuación se añadieron 200 µl por pocillo de diluciones 1:10.000 de estándares de PCR pura y de muestras de saliva sin diluir o diluidas 1:50 en tampón de ensayo (tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,75, conteniendo NaCl 0,9%, NaN₃ 0,05%, BSA 0,5%, Tween 40 0,01%, 0,05 γ-globulina bovina, 20 µM ácido dietilenetriamina- pentacético y 20 µg/ml Roja Cereza). La curva estándar fue preparada cubriendo un rango de concentración de proteína C-reactiva que fue desde los 0,1 a los 20 ng/ml. Todas las muestras fueron incubadas durante 45 minutos en agitación continua y después de un segundo lavado, se aplicaron 200 µl de anticuerpos anti-PCR canina marcados con europio a cada pocillo. Se volvió a incubar durante 45 minutos y posteriormente se realizó otro lavado. Finalmente, se añadieron 200 µl por pocillo de solución intensificadora, la cual contiene glicina-NaOH 50 mM (pH 10), NaSCN 1,75 M, Na₂CO₃ 5 mM, NaCl 1 M, glicerol 5% y 1-propanol 20% y se incubó durante 20 minutos. La fluorescencia desarrollada, proporcional a la cantidad de PCR presente en la muestra, fue medida en el contador multitécnica VICTOR 1420 (PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy; Turku, Finland).

15 Referencias

1. **Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I:** 1996, Simultaneous quantification of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay. *J Immunol Methods* 190: 171-183.
2. **Barnett JI, Hemsworth PH:** 1990, The validity of physiological and behavioural measures of animal welfare. *Appl Anim Behav Sci* 25: 177-187.
3. **Beerda B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA:** 1996, The use of saliva cortisol, urinary cortisol and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. *Horm Behav* 30: 272-279.
4. **Beerda B, Schilder MBH, Van Hoof JARAM, et al.:** 1998, Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 58: 365-381.
5. **Beerda B, Schilder MBH, Van Hoof JARAM, et al.:** 2000, Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Anim Welf* 9: 49-62.
6. **Caspi D, Snel FW, Batt RM, et al.** C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res* 1987; 48: 919-921.
7. **Costigan DC, Guyda HJ, Posner BI:** 1988, Free insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II in human saliva. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 1044-1048.
8. **Eriksson S., Vehniäinen M., Jansen T., Meretoja V., Saviranta P., Pettersson K., Lövgren T.** 2000. Dual-label time-resolved immunofluorometric assay of free and total prostate-specific antigen based on recombinant Fab fragments. *Clin. Chem.* 46: 658-666.
9. **Fiet J, Boudi A, Giton F, et al.:** 2000, Plasma 21-deoxycortisol: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a biotinylated tracer with a radioimmunoassay using 125iodine. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72: 55-60.
10. **German AJ, Hall EJ, Day MJ:** 1998, Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. *Vet Immunol Immunopathol* 64: 107-121.
11. **Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, et al.:** 2001, A Comparison of the Concentrations of C-reactive Protein and α1-Acid Glycoprotein in the Serum of Young and Adult Dogs with Acute Inflammation. *Vet Res Comm* 25: 117-120.
12. **Hiss S, Knura-Deszczka S, Regula G, Hennies M, Gymnich S, Petersen B, Sauerwein H.** 2003. Development of an enzyme immuno assay for the determination of porcine haptoglobin in various body fluids: testing the significance of meat juice measurements for quality monitoring programs. *Vet Immunol Immunopathol* 96: 73-82.
13. **Kasempimolporn S, Saengseesom W, Lurnlertdacha B, Sitprija V:** 2000, Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 38: 3098-3099.
14. **Kimura H, Mukaida M, Wang G:** 2000. Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay of psychopharmaceuticals and stimulants in serum. *Forensic Sci Int* 113: 345-351.
15. **Kirschbaum C, Helhammer D:** 1994, Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19: 313-333.
16. **Kobelt AJ, Hemsworth Ph, Barnett JI, Butler KL:** 2003, Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Res Vet Sci* 75: 157-161.
17. **Kugler J, Hess M, Haake D:** 1992, Secretion of salivary immunoglobulin A in relation to age, saliva flow, mood states, secretion of albumin, cortisol and catecholamines in saliva. *J Clin Immunol* 12: 45-49.

18. **Kushner I, Gewurz H, Benson MD.** 1981. C-reactive protein and the acute phase response. *J. Lab Clin Med* 97: 739-749.

19. **Lac G, Lac N, Robert A:** 1993, Steroid assays in saliva: a method to detect plasmatic contaminations. *Arch Int Physiol Bioch Biophys* 101: 257-262.

20. **Lac G:** 2001, Saliva assays in clinical and research biology. *Pathol Biol* 49: 660-667.

21. **Lövgren, T., Pettersson, P.,** 2000. Time-resolved fluoroimmunoassay, advantages and limitations. In: Van Dyke, K., Van Dyke, R., (eds), *Luminescence immunoassay and molecular applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 233-253.

22. **Martínez-Subiela S., Tecles F., Eckersall P.D., Cerón J.J.** 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.* 150: 241-244.

23. **McNair J., Kennedy D.G., Bryson D.G., Reilly G.A.C., McDowell S.W.J., Mackie D.P.** 1997. Evaluation of a competitive immunoassay for the detection of bovine haptoglobin. *Res. Vet. Sci.* 63: 145-149.

24. **Moya L, Boyle L, Lynch PB, Arkins S:** 2003, Measurement of pro-inflammatory cytokines in saliva: a potential indicator of animal welfare. Proceedings of the Fourth European Colloquium on Acute Phase Proteins. Segovia, Spain. 25-26 September.

25. **Otake K, Ito T, Sugimoto T, et al.** 2000. C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Lab Anim* 34: 434-438.

26. **Parra MD, Bernal LJ, Cerón JJ:** 2004, Cortisol and free thyroxine determination by Time-resolved fluorometry in canine serum. *Can J Vet Res* 68: 98-104.

27. **Pederson ED, Stanke SR, Whitener SJ, et al.:** 1995, Salivary levels of $\alpha 2$ -macroglobulin, $\alpha 1$ -antitrypsin, c-reactive protein, cathepsin g and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Archs oral Biol* 40: 1151-1155.

28. **Pettersson K., Katajmi T., Irjala K., Leppänen V., Majamaa-Voltii K., Laitinen P.** 2000. Time-resolved fluorometry (TRF)-based immunoassay concept for rapid and quantitative determination of biochemical myocardial infarction markers from whole blood, serum and plasma. *Luminescence* 15: 399-407.

29. **Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, et al** 1994, C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis. *J Clin Microbiol* 32: 912-917.

30. **Soukka T, Paukkunen J, Härmä H, et al.:** 2001, Supersensitive Time-resolved Immunofluorometric Assay of Free Prostate-specific Antigen with Nanoparticle Label Technology. *Clin Chem* 47: 1269-1278.

31. **Tarkkinen P, Palenius T, Lövgren T:** 2002, Ultrarapid, Ultrasensitive One-Step Kinetic Immunoassay for C-Reactive Protein (CRP) in Whole Blood Samples: Measurement of the Entire PCR Concentration Range with a Single Sample Dilution. *Clin Chem* 48: 269-277.

32. **Vincent IC, Michell AR:** 1992, Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci* 53: 342-345.

33. **Whitener SJ, Turner DW, Pederson ED:** 1994, C-reactive protein and $\alpha 1$ -antitrypsin in human saliva as indicators of periodontal disease. *Northwest Dent Res* 4: 26-29.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la proteína C-reactiva en saliva y otros fluidos de distintas especies animales, **caracterizado** por consistir en un método de fluoroinmunoensayo en tiempo retardado, que consta de las siguientes etapas:

a) marcaje de anticuerpos con europio

b) biotinilación de anticuerpos

c) purificación de la proteína C-reactiva

d) realización del inmunoensayo.

2. Procedimiento para determinar la proteína C-reactiva de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por el uso de anticuerpos biotinilados como anticuerpos de captura o primarios.

3. Procedimiento para determinar la proteína C-reactiva de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por el uso de anticuerpos marcados con quelato de europio como anticuerpos trazadores o secundarios.

4. Uso del procedimiento según las reivindicaciones anteriores, para determinar la proteína C-reactiva en saliva, sangre entera, suero, plasma, efusiones y otros fluidos de diferentes especies animales.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 304 189

⑫ Nº de solicitud: 200401268

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 26.05.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9216839 A1 (KANKARE, JOUKO) 01.10.1992, descripción, especialmente ejemplo 1 y figuras 1-7.	1-3
X	(E.F. GUDGIN DICKSON, A. POLLAK, E.P. DIAMANDIS), "Time-resolved detection of lanthanide luminescence for ultrasensitive bioanalytical assays", Journal of Photochemistry and Photobiology (1995), B: Biology, 27:3-19. Todo el documento, especialmente los puntos 1.1, 2.1 y 2.2 y la figura 7.	1-3
X	(M.C. GOBELLO, O.A. BROWN, J.R. RONDERO), "Determinaciones hormonales", Analecta Veterinaria (1998), vol. 18, 1/2:71-81, ISSN 0365-5148. Página 72, columna 1, primer párrafo.	4
A	EP 0493745 A1 (DOJINDO LABORATORIES) 08.07.1992, todo el documento.	1-4
A	EP 0290269 A2 (CYBERFLUOR INC.) 09.11.1988, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

05.08.2008

Examinador

A. García Coca

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)