



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 173**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09170735 .6**
96 Fecha de presentación : **05.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2128612**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Control inmunológico basado en IP-10.**

30 Prioridad: **05.09.2006 DK 2006 01145**
20.02.2007 DK 2007 00262

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.08.2011

73 Titular/es: **HVIDOVRE HOSPITAL**
Kettegard Allé 30
2650 Hvidovre, DK

72 Inventor/es: **Ruhwald, Morten;**
Ravn, Pernille y
Eugen-Olsen, Jesper

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 364 173 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

Control inmunológico basado en IP-10

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere en general a un ensayo inmunológico y, más particularmente, un ensayo para medir la reactividad inmune mediada por células (CMI). Incluso más particularmente, la presente descripción proporciona un ensayo y un kit para medir la respuesta mediada por células a un antígeno usando sangre entera u otras muestras biológicas adecuadas. El ensayo es útil en protocolos terapéuticos y diagnósticos para aplicaciones humanas, ganaderas y veterinarias y de la fauna salvaje.

10 La medición de las respuestas inmunes mediadas por células es importante para la diagnosis inmune de muchas enfermedades infecciosas y autoinmune, como un marcador para inmunocompetencia, y para detección de respuestas de células T a antígenos endógenos y exógenos (es decir, infecciones y vacunas).

15 La presente descripción proporciona un procedimiento para medir la CMI en un mamífero mediante la incubación de una muestra del mamífero que comprende células T u otras células del sistema inmune con un antígeno. Después se detecta la producción de IP-10. La presencia o nivel del efector inmune es después indicativo del nivel de sensibilidad mediada por células del sujeto y permite el diagnóstico de una infección provocada por Mycobacterias.

Antecedentes de la invención

Tuberculosis

20 El descubrimiento de antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ha conducido a una nueva línea de enfoque significativa para la diagnosis de la tuberculosis (TB). Trabajos anteriores han mostrado el potencial para reemplazar la prueba cutánea de la tuberculina (TST) mediante una prueba que ensaya la producción in vitro de interferón gamma (IFN- γ) mediante células T en respuesta a antígenos de MTB definidos. Aproximadamente al mismo tiempo, un avance principal fue el descubrimiento de los antígenos altamente inmunogénicos de la diana 6 antigénica de secreción precoz (ESAT-6), proteína 10 de filtrado de cultivo (CFP-10) y TB7.7 que mejoran la especificidad significativamente. Estos antígenos están codificados dentro de región de diferencia 1 (RD1) del patógeno y están por lo tanto ausentes de todas las cepas de vacuna Bacille Calmette Guerin (BCG) y la mayoría de Mycobacterias no tuberculosas (las excepciones incluyen *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* *Mycobacterium szulgai*). Las respuestas de IFN- γ a la superposición de péptidos de los antígenos ESAT-6, CFP-10, TB7.7 codificados por RD1 forman la base de la detección de la infección por MTB en dos ensayos con licencia y comercialmente disponibles.

30 QuantiFERON-TB Gold (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia), un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) de sangre entera tiene la aprobación de la calificación de la CE Europea y recientemente recibió la aprobación de la Administración de Alimentos y Fármacos Americana (FDA) para la detección de tanto la infección como enfermedad por TB.

35 T-SPOT.TB (Oxford Inmunotec, Oxford, Reino Unido), un ensayo de inmunotransferencia ligado a enzima (ELISPOT) que usa células mononucleares de sangre periférica tiene la aprobación de la calificación de la CE Europea y se aprobó para uso en Canadá en 2005. TSPOT. TB solamente usa ESAT-6 y CFP10.

Sin embargo, las limitaciones de los ensayos actualmente disponibles son:

- 1) La sensibilidad puede estar alterada en individuos inmunosuprimidos (tales como VIH positivos o pacientes que reciben medicación inmunosupresora),
- 2) En algunas situaciones es necesario un volumen relativamente grande de sangre (3 ml por ensayo de QuantiFERON y 8 ml para el T-SPOT.TB), que puede limitar su uso en bebés y niños gravemente enfermos y anémicos,
- 3) Los ensayos no discriminan entre infección activa, latente y reciente
- 4) No se ha demostrado que los ensayos sean capaces de predecir quién pasará de TB reciente o latente a TB activa.

45 La mayoría de las limitaciones de de los ensayos son debidas a la medición del parámetro de efecto del IFN- γ a niveles muy bajos, cerca del límite incluso del procedimiento más sensible (en el ensayo QuantiFERON bajan hasta 0,35 UI/ml (17,5 pg/ml) y en el TSPOT. TB 5 manchas/campo). La disminución del corte para potenciar la sensibilidad eventualmente dará como resultado una especificidad alterada de los ensayos. Una publicación reciente basada en el ensayo QuantiFERON ha mostrado que el ensayo repetido de personas con resultados de ensayo en el intervalo inferior

de IFN- γ varía alrededor del nivel de corte que subraya el riesgo potencial de resultados falso positivos y falso negativos del ensayo QuantiFERON (QFT) (Pai, M. et al).

Para superar la fragilidad evidente de los ensayos, la sensibilidad se puede mejorar mediante el uso de antígenos específicos de *M. tuberculosis* y esto se ha realizado en la tercera generación de los ensayos QuantiFERON (QFT), el QuantiFERON en tubos de ensayo (QFT-IT) que ahora comprende un antígeno adicional llamado TB7.7(p4) y la sensibilidad potencialmente se mejora, pero todavía depende de las mediciones a muy bajos niveles de IFN- γ .

Este planteamiento ha sido ensayado por otros, es decir, recientemente se ha mostrado que Monokine inducida por IFN- γ (MIG/ CXCL9) se expresaba específicamente in vitro después de la estimulación con antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6/CFP10) y PPD. Sin embargo la sensibilidad de CXCL9, era mucho menor y más baja que la de IFN- γ . Otro estudio más reducido, basado en la citometría de citoquinas intracelulares en células CD4+ T después de estimulación de ESAT-6, probó si la expresión de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 o el marcador de activación CD40L puede distinguir enfermedad de TB de no TB. Ninguno de estos marcadores se encontró que eran comparables o superiores a IFN- γ (Abramo C, et al) (Hughes, A. et al).

Todavía no se han identificado marcadores sensibles y específicos para reemplazar IFN- γ para diagnóstico de infección por TB en la bibliografía publicada actualmente. Varios han descrito IP-10 en relación con las infecciones, pero no como un marcador en la diagnosis de infección con una estimulación de antígeno anterior.

Clamidia

La diagnosis de infecciones genitales por Clamidia evolucionaron rápidamente desde los años 1990. Los ensayos de amplificación de ácido nucleico (NAAT), tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación basada en la transcripción (TMA), y el ensayo de amplificación con desplazamiento de cadena de DNA (SDA) son ahora los soportes principales. Los NAAT de Clamidia más comúnmente usado y ampliamente estudiado en los Estados Unidos y otros muchos países industrializados son Aptima (Gen-Probe), Probe-Tec (Becton-Dickinson), y Amplicor (Roche). El ensayo Aptima Combo II ensaya simultáneamente para *C. trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, la causa de gonorrea. NAAT para Clamidia se puede realizar sobre muestras de escobillón recogidas del cuello uterino (mujeres) o uretra (hombres)

Actualmente, los NAAT tienen aprobación reguladora solamente para muestras de ensayo urogenitales. Los NAAT han reemplazado ampliamente el cultivo, el estándar de oro histórico para la diagnosis de Clamidia, y los ensayos de sonda no amplificados, tales como Pace II (Gen-Probe). El ultimo ensayo es relativamente insensible, detectando exitosamente solamente el 60 - 80 % de las infecciones en mujeres asintomáticas, y proporcionando ocasionalmente resultados falso positivos. El cultivo permanece útil en circunstancias seleccionadas y es actualmente el único ensayo aprobado para ensayar muestras no genitales.

De este modo la diagnosis de Clamidia está basada en una la tecnología complicada y que requiere recursos tal como PCR, no disponibles fácilmente en el mundo en vías de desarrollo. Una tecnología rápida y fácil mejoraría las mediciones de diagnóstico para esta enfermedad importante.

El documento CA 2.478.138 describe que los niveles elevados en sangre de la quimioquina CXCL10 están asociados a la insuficiencia respiratoria (por ejemplo SARS, influenza y neumonía adquirida en comunidad) y son útiles en la diagnosis de pacientes. Se proporcionan procedimientos para la diagnosis y tratamiento de pacientes que padecen insuficiente respiratoria.

El documento WO 05/091969 describe marcadores de TSE (Encefalopatías Espongiformes Transmisibles) que están presentes antes de la formación de proteína de príon detectable patológica y son útiles para detectar esta infección antes de los signos clínicos. IP-10 es justo uno de los varios marcadores descritos y esta solicitud no describe ninguna estimulación de antígeno.

El documento US2004-038201 describe distintos programas de expresión génica activados en respuesta a diferentes patógenos en macrófagos. IP-10 es precisamente de nuevo uno de los muchos marcadores mencionados y esta solicitud no describe ninguna estimulación de antígeno.

Annalisa Azzurri et al. describen que la proteína 10 inducible por IFN- γ y los niveles en plasma de pentraxina 3 son herramientas para controlar la inflamación y actividad de la enfermedad en infección por *Mycobacterium Tuberculosis*. El artículo muestra que el nivel en plasma de IP-10 se incrementa espontáneamente en los pacientes con TB, igualmente esta referencia no describe ninguna estimulación de antígeno.

El documento WO 03/063759 describe un procedimiento de identificación de péptido derivado de proteína de choque térmico (Hsp), útil para la diagnosis o la terapia. El efecto de los compuestos de esta invención se ensayó sobre

monocitos de sangre periférica midiendo el nivel de IP-10 en respuesta a la estimulación posterior con LPS. La estimulación directa con los compuestos sin estimulación posterior con LPS, no dio lugar a un incremento en el nivel de IP-10.

5 El documento WO 07/039400 describe un procedimiento y un kit para la diagnosis del Síndrome de Restauración Inmune que está asociado a tuberculosis (TB-IRS) en pacientes infectados con tuberculosis así como pacientes infectados conjuntamente con VIH/TB. Con el fin de diagnosticar TB-IRS los inventores detectaron el nivel de respuesta de Th1 frente a PPD y/o una proteína de 16 KDA en comparación con la respuesta de Th1 frente a ESAT-6, CFP-10, 85B (control negativo) y usaron un incremento de respuesta de Th1 como un indicador de TB-IRS.

10 Para superar los problemas de sensibilidad alterada y bajos niveles de IFN- γ detectable por los ensayos actualmente disponibles que usan estimulación de antígeno, los presentes inventores sugieren el uso de un biomarcador alternativo diferente de IFN- γ .

Sumario de la invención

15 La presente invención propone un principio diagnóstico novedoso tal como se define en las reivindicaciones. Un sistema de ensayo que puede detectar la infección con por ejemplo tuberculosis, leishmaniasis o Chlamydia, basándose en la medición de la quimiocina IP-10 después de la estimulación de células inmunes con proteínas/péptidos antigénicos.

20 El IP-10 del sistema de ensayo es más sensible que los ensayos basados en IFN- γ como parámetro de efecto, mejora el ensayo y la diagnosis. El ensayo se puede realizar usando cantidades menores de sangre debido a que las muestras se pueden diluir en el momento de la incubación o antes de análisis. El ensayo se puede realizar en períodos de tiempo más cortos. Además, el sistema de ensayo puede permitir la discriminación entre diversas fases de infección tal como por ejemplo infección por TB activa, reciente y latente.

25 En breve la presente descripción se puede describir como un procedimiento inmunológico que comprende las etapas de incubar una muestra obtenida de un mamífero con al menos un antígeno, determinar el nivel de IP-10 en dicha muestra y comparar dicho nivel de IP-10 determinado con un nivel de referencia, determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno que genera la reactividad inmunológica para el antígeno, o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada al antígeno.

Descripción detallada

30 La presente descripción proporciona un ensayo del potencial o la capacidad de un sujeto para producir una respuesta de CMI. El ensayo se basa en la medición de producción de la molécula de efector inmune por las células del sistema inmune en respuesta a estimulación antigénica. Los efectores inmunes se pueden detectar usando ligandos tales como anticuerpos específicos para los efectores o midiendo el nivel de expresión de los genes que codifican los efectores.

La presente descripción proporciona, por lo tanto, medios para determinar la sensibilidad de CMI en un sujeto y, a su vez, proporciona medios para la diagnosis de enfermedades infecciosas, afecciones patológicas, nivel de inmunocompetencia y un marcador de sensibilidad de células T a antígenos endógenos o exógenos

35 Un aspecto de la descripción se refiere a un ensayo del potencial o la capacidad de un sujeto para producir una respuesta de IP-10. El ensayo se basa en la medición de la producción de IP-10 por las células del sistema inmune en respuesta a la estimulación antigénica. La producción de IP-10 se puede detectar usando ligandos tales como anticuerpos específicos para IP-10 o midiendo el nivel de expresión de los genes que codifican IP-10. Los presentes inventores han demostrado el principio de ensayo usando dos tipos diferentes de infección :Tuberculosis y Chlamydia. En el caso de tuberculosis un ensayo a base de estimulación específica de *M. Tuberculosis* y posterior determinación de IP-10, puede identificar a las personas infectadas con *M. tuberculosis*. En el caso de Chlamydia un ensayo basado en la estimulación con extracto de *C.trachomatis* puede identificar a personas infectadas con Chlamydia.

40 El sistema de ensayo descrito mide niveles más altos de biomarcador IP-10, que los niveles de IFN- γ , el marcador de los ensayos actualmente disponibles están basados en esto. El sistema de ensayo basado en IP-10 es tan específico y más sensible que los ensayos basados en por ejemplo IFN- γ como parámetro de efecto, mejora el ensayo y la diagnosis de individuos inmunocomprometidos (Ejemplo 10), el ensayo se puede realizar usando cantidades menores de sangre debido a que las muestras se pueden diluir en el momento de la incubación o antes de análisis (Ejemplos 9 y 13). También mejora la velocidad de diagnosis, ya que IP-10 se produce en cantidades significativas después de unas pocas horas de incubación como se muestra en el ejemplo 11. En el caso de tuberculosis, el sistema de ensayo puede permitir la discriminación entre infección de TB activa, reciente y latente y, además el sistema de ensayo es potencialmente capaz de identificar a las personas en riesgo de progresar a TB activa. El sistema de ensayo se basa en la detección de IP-10 usando un inmunoensayo (es decir, ELISA o Luminex) y el sistema de ensayo se puede desarrollar potencialmente

en un ensayo inmunocromatográfico fácil de usar y aplicable en situaciones de bajos recursos, donde el resultado de ensayo se presenta mediante un color de reacción detectable a simple vista.

El ensayo descrito en la presente invención soluciona toda una serie de problemas.

5 Los ensayos actualmente disponibles miden el parámetro de efecto IFN- γ a muy bajos niveles, cerca del límite de incluso los procedimientos de detección más sensibles (en el caso de ensayos de tuberculosis, el ensayo de QuantiFERON tiene un nivel de corte para el ensayo positivo de 0,35 unidades internacionales/ml (17,5 pg/ml) y en el ensayo de T-SPOT.TB 5 unidades formadoras de mancha /campo). La disminución del corte para potenciar la sensibilidad eventualmente dará como resultado una especificidad alterada de los ensayos. Las publicaciones basadas en el ensayo Quantiferon han mostrado que el ensayo repetido de las personas con resultados de en el intervalo inferior de IFN- γ varía alrededor del nivel de corte que señala el riesgo potencial de resultados falso positivos y falsos negativos del ensayo de Quantiferon (QFT). Además el ensayo actual puede proporcionar resultados falsos positivos en individuos inmunosupresores que son incapaces de producir una respuesta de IFN- γ por encima del nivel de corte. Como la cantidad de liberación de IP-10 es mucho más alta que la estimulación de antígeno cuando se compara con IFN- γ : la sensibilidad es mayor, menores ensayos se consideran falso negativos, los resultados de ensayo son más reproducibles, y, menos resultados de ensayo indeterminados se esperan en individuos inmunosuprimidos.

Además, debido a que el IP-10 inducido por antígeno se secreta en concentraciones tan altas es posible diluir la muestra antes o después de la etapa de incubación. Esto significa que la cantidad de material de muestra (por ejemplo sangre entera) necesaria para realizar el ensayo se puede reducir por ejemplo en el caso de disminución de sangre entera, hasta o incluso por debajo de 0,25 ml, tal como 0,20 ml, por ejemplo 0,15 ml, tal como 0,1 ml, por ejemplo 0,05 ml. En una realización preferida el ensayo se puede realizar a 0,1 ml o menos. De este modo se puede desarrollar un "mini ensayo" adecuado para pacientes con bajo volumen de sangre (por ejemplo niños/bebés o anémicos). Además, usando por ejemplo sangre de por ejemplo un pinchazo en el dedo, el mini ensayo se puede realizar incluso de manera más favorable para el usuario ya que se evita una punción en vena.

Además, en el caso de tuberculosis ninguno de los ensayos actualmente disponibles puede discriminar entre infección activa y latente. Sorprendentemente los inventores encontraron que la concentración de IP-10 en el material de muestra no estimulado pero incubado es decir, la muestra nula (por ejemplo sangre entera), es mayor entre pacientes con enfermedad activa comparado con individuos sanos con enfermedad latente. Los presentes inventores proponen que la concentración de IP-10 en el material de muestra incubado con una solución inactiva (Nil) en combinación con un ensayo específico de antígeno se puede usar como marcador para la infección activa (por ejemplo tuberculosis) frente a la infección latente (por ejemplo tuberculosis).

El ensayo

De este modo, un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento inmunológico que comprende las etapas de:

- a) incubar una muestra obtenida de mamífero con al menos un antígeno de ensayo
- 35 b) determinar el nivel de IP-10 en dicha muestra
- c) comparar dicho nivel determinado de IP-10 con un nivel de referencia, determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno de ensayo que genera reactividad inmunológica para el antígeno de ensayo o ha encontrado previamente los antígenos que generan reactividad cruzada inmunológica para el antígeno de ensayo.

Se ha de entender que cualquiera de de los procedimientos descritos en la presente invención es independiente de la plataforma. De acuerdo con lo anterior, cualquier procedimiento inmunológico, pero sin limitarse a ellos, tales como ELISA, Luminex, Multiplex, enmunotransferencia, ensayos de TRF, ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, técnicas de Inmunoensayo enzimático homogéneo, ensayo RAST, radioinmunoensayos, inmunofluorescencia y diversos inmunoensayos con tiras reactivas secas (Dry Stick) (por ejemplo ensayo cromatográfico con tira reactiva seca) pueden ser aplicables a la presente invención.

45 La presente descripción también se refiere a un procedimiento para diagnosticar una infección, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

- a) incubar una muestra obtenida de mamífero con al menos un antígeno de ensayo con la condición de que dicho antígeno de ensayo no sea PPD o LPS
- b) determinar el nivel de IP-10 en dicha muestra

c) comparar el nivel determinado de IP-10 con un nivel de referencia, determinando por lo tanto si dicho mamífero está infectado con un microorganismo si el nivel de IP-10 determinado encontrado está por encima del nivel de referencia.

5 Los presentes inventores han demostrado que la estimulación directa con el (los) antígeno(s) de ensayo seleccionado(s) o el (los) antígeno(s) para evaluación es suficiente para obtener una lectura que permita al experto en la técnica concluir si la muestra ha encontrado el (los) antígeno(s) de ensayo que genera(n) reactividad inmunológica para el (los) antígeno(s) de ensayo o ha encontrado previamente otros antígenos de ensayo que generan reactividad cruzada inmunológica para el (los) antígeno(s) de ensayo.

De este modo, en una realización, la presente descripción también se refiere a procedimientos inmunológicos como se describe en el presente documento, en la que se excluye cualquier estimulación adicional o posterior.

10 La estimulación posterior o adicional puede cubrir cualquier tipo de estimulación por ejemplo cebando o estimulando una muestra con una sustancia biológica inactiva o una sustancia con efecto biológico relacionado con la respuesta inflamatoria, tales como, pero sin limitarse a ellos, agentes mitógenos, productos bacterianos o proteínas activas biológicas.

15 De este modo, en una realización, la presente descripción se refiere a procedimientos inmunológicos como se describe en el presente documento, en la que se excluye cualquier estimulación adicional o posterior con LPS.

De acuerdo con lo anterior, dicho procedimiento es aplicable para la detección de una infección en por ejemplo personas que están en alto riesgo de desarrollar enfermedades infecciosas tales como, pero sin limitarse a ellas, Tuberculosis, Clamidia, Leishmania, Tripanosoma y Schistosoma.

20 La presente descripción también se refiere a un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en la que la muestra está dividida en al menos 2 fracciones y

a) se incuba la primera fracción de la muestra con el (los) antígeno(s) de ensayo para generar una muestra de respuesta

b) se incuba la segunda fracción de la muestra con una solución inactiva para generar una muestra nula

c) se determina el nivel de IP-10 en las dos fracciones

25 d) se determina la respuesta de IP-10 dependiente de antígeno de la muestra restando el nivel de IP-10 determinado en la muestra nula de la IP-10 determinada en la muestra de respuesta

e) se compara la respuesta de IP-10 dependiente del antígeno de ensayo o un valor derivado del mismo con el nivel de referencia o su valor derivado del mismo,

30 determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el (los) antígeno(s) de ensayo y de este modo genera(n) reactividad inmunológica al (a los) antígeno(s) de ensayo o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada inmunológica al (a los) antígeno(s) de ensayo y/o va a desarrollar infección.

En una realización el rendimiento del ensayo se puede potenciar mediante la adición concomitante de una molécula inmunoestimuladora con el antígeno seleccionado para evaluación, siendo dicha molécula inmunoestimuladora una citoquina seleccionada el grupo no limitante que consta de IL-2, IL-12, TNF- α , y IFN- γ .

35 En otra realización la molécula inmunoestimuladora es un receptor soluble (por ejemplo di- o polímero de las moléculas B7 (CD80/CD86)) o un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo de unión a CD28).

En otra realización la molécula inmunoestimuladora tiene la propiedad de proporcionar a células T una señal coestimuladora (conocida por los expertos en la técnica como la señal 2), siendo dicha señal coestimuladora incapaz de inducir una respuesta de IP-10 sola pero que incrementará la respuesta de IP-10 si las células generan una respuesta de CMI al antígeno seleccionado para evaluación.

40 En otra realización la potenciación del ensayo se puede lograr mediante la inhibición del proceso anti-inflamatorio que se produce durante la etapa de incubación. En una realización el ensayo se puede potenciar con la inhibición de anticuerpos o receptores solubles que se unen a moléculas anti-inflamatorias tales como, pero sin limitarse a ellas, IL-4, IL-10 y TGF- β .

45 En otra realización la potenciación del ensayo se puede lograr mediante la inhibición de la anti-inflamación mediada a través de la inhibición o eliminación de poblaciones de células que actúan como inhibidores a la respuesta de CMI, tales como células T reguladoras.

Específicamente como se usa en el presente documento el término Derivado de Proteína Purificada (PPD o tuberculina) es un precipitado de moléculas de especies no específicas. PPD o tuberculina se obtiene mediante extracción de proteínas de una mezcla de *M. tuberculosis* u otras Mycobacterias tal como *M. avium*. PPD se usa comúnmente en el ensayo para la presencia de inmunidad celular o la respuesta de Th1 generadas o bien frente a BCG o frente a *M. tuberculosis*. Por ejemplo, se puede obtener del TubersolB de Connaught Laboratories Limited preparado de un lote matriz grande, Connaught Tuberculin (CT68), o en la forma de RT23 obtenida de Statens Serum Institute (SSI, Copenhagen Dinamarca).

La proteína ESAT-6 (diana antigénica 6 de secreción precoz) es un antígeno secretado principal que se ha purificado a partir de filtrados de cultivos a corto plazo de *M. tuberculosis*. Como se menciona en el presente documento ESAT-6, CFP- 10 (proteína 10 de filtrado de cultivos) y 85B se puede obtener de lisado y purificación de células, mediante técnicas recombinantes o producido como péptidos sintéticos. Por ejemplo ESAT6 se puede obtener como una proteína recombinante de Statens Serum Institute.

La tuberculina o PPD (derivado de proteína purificado) difiere de ESAT-6, (diana antigénica 6 de secreción precoz) CFP-10 (proteína 10 de filtrado de cultivos), y TB7.7 que están codificadas por genes (en la región RD-1) localizadas solamente dentro del genoma de *M. tuberculosis* y no están contenidas en BCG (el Bacilo de Calmette et Guerin). Difiere de PPD debido a que PPD también contiene otros antígenos que están compartidas con por ejemplo subcepas de BCG y con varias especies de micobacterias no tuberculosas con baja o ninguna patogenicidad.

Opcionalmente, el procedimiento puede además comprender la división de la muestra en 3 fracciones e incubación de la tercera fracción de la muestra con un activador de las células T para generar un control positivo. Aquí las células inmunes se pueden incubar en por ejemplo tres poblaciones separadas: control nulo (por ejemplo solución salina), estimulada por Ag (por ejemplo proteínas específicas de *Chlamydia* o *tuberculosis* o sus derivados) y control positivo (por ejemplo Fitohemaglutinina). Las células inmunes pueden estar en la forma de sangre entera, sangre entera diluida o diversas purificaciones de una población celular tal como células mononucleares de sangre periférica, monocitos o células T. Las células se pueden obtener a partir de sangre, orina, líquido pleural, líquido bronquial, lavados orales, biopsias de tejidos, ascitis, pus, líquido cefalorraquídeo, aspirado, y/o líquido folicular. Las células inmunes se incuban durante por ejemplo 4 - 24 h a 37 °C.

En una realización, la muestra se divide en al menos 2 fracciones y

a) se incuba la primera fracción de la muestra con el antígeno para generar una muestra de respuesta

b) se incuba la segunda fracción de la muestra con una solución inactiva para generar una muestra nula

c) se determina el nivel de IP-10 en las dos fracciones

d) se determina la respuesta dependiente de antígeno de IP-10 de la muestra restando el nivel de IP-10 determinado en la muestra nula de la IP-10 determinada en la muestra de respuesta

e) se compara la respuesta dependiente de antígeno de IP-10 o un valor derivado de ella con el nivel de referencia o un valor derivado del mismo,

f) se compara la respuesta de IP-10 espontánea de antígeno o un valor derivado de ella con el nivel de referencia o un valor derivado del mismo,

determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno y de este modo genera reactividad inmunológica al antígeno o ha encontrado previamente otros antígenos que generan reactividad cruzada inmunológica al antígeno y determinando por lo tanto si el mamífero tiene una infección activa, reciente, o latente si el mamífero está respondiendo al tratamiento, o va a desarrollar infección.

Más específicamente, la muestra se divide en al menos 3 fracciones y

a) se incuba la primera fracción de la muestra con el antígeno para generar una muestra de respuesta

b) se incuba la segunda fracción de la muestra con una solución inactiva para generar una muestra nula

c) se incuba la tercera fracción de la muestra con una solución estimuladora (por ejemplo PHA) para generar una muestra mitógena

c) se determina el nivel de IP-10 en las tres fracciones

d) se determina la respuesta dependiente de antígeno de IP-10 de la muestra restando el nivel de IP-10 determinado en la muestra nula de la IP-10 determinada en la muestra de respuesta

e) se compara la respuesta dependiente de antígeno de IP-10 o un valor derivado de ella con el nivel de referencia o un valor derivado del mismo

5 f) se determina la respuesta de IP-10 dependiente de mitógeno de la muestra restando el nivel de IP-10 determinado en la muestra nula de la IP-10 determinada en la muestra mitógena

g) se compara la respuesta de IP-10 dependiente de mitógeno o un valor derivado de ella con el nivel de referencia o un valor derivado del mismo,

10 h) se compara la respuesta de IP-10 espontánea de antígeno o un valor derivado de ella con el nivel de referencia o un valor derivado del mismo,

determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno y de este modo genera reactividad inmunológica al antígeno o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada inmunológica al antígeno y determinando por lo tanto si el mamífero tiene una infección activa, reciente, o latente o si el mamífero está respondiendo al tratamiento, o va a desarrollar infección, o está inmunosuprimido.

15 El término "mitógeno" se refiere a cualquier sustancia química o composición química que promueve la división celular. Los mitógenos pueden actuar tanto sobre las células T como sobre células B o bien separadamente o simultáneamente. De acuerdo con lo anterior, el término mitógeno también cubre los términos activador de células T y activador de células B, y de este modo se usa en el presente documento indistintamente. Los mitógenos de la presente descripción cubren todos los mitógenos conocidos por los expertos en la técnica tales como, pero sin limitarse a ellos, fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (conA) lipopolisacárido (LPS) y mitógeno de hierba camín (PWM). En una realización preferida de la presente descripción el mitógeno es un activador de células T e incluso más preferiblemente el mitógeno es PHA. En otra realización preferida de la presente descripción el mitógeno es un activador de monocito/macrófago. La producción de IP-10 después se determina mediante cualquier procedimiento de citoquina o quimioquina conocido por los expertos en la técnica tales como, pero sin limitarse a ellos, tecnologías a base de anticuerpo por ejemplo xMAP, multiplexing, Luminex, ELISA, ELISPOT, ensayo de tira reactiva (Stick) lateral o técnicas a base de ARNm tales como reacción en cadena de la polimerasa de tiempo real (RT-PCR) o citometría de flujo intracelular (IC-FACS).

20

25

La cantidad de IP-10 en respuesta a antígenos (por ejemplo antígenos de extracto de Clamydia o proteínas específicas de tuberculosis o sus derivados) se puede determinar restando la producción de fondo de IP-10 y la infección probable con por ejemplo M. tuberculosis se interpreta basándose en esta respuesta de IP-10 específica de antígeno.

30 Los datos de tuberculosis de la presente solicitud se desarrollan usando la tecnología existente: QuantiFERON® TB-Gold en tubo de ensayo (Cellestis, Carnegie, Australia), en el que se extrae sangre entera directamente en tubos Vacutainer revestidos previamente con solución salina (nula), antígenos de péptido específicos de TB (Ag) o mitógeno (PHA). En una realización aquí preferida los tubos se incubaron 18 h a 37 °C, donde se midió después la concentración de citoquinas mediante tecnología xMAP sobre la plataforma Luminex (Luminex Corporation, Estados Unidos), usando reactivos Biosource (Biosource Camarillo Estados Unidos), y de este modo fue capaz de cambiar el parámetro de efecto del parámetro tradicional IFN- γ a IP-10, que se expresa a mayores concentraciones y da mejores resultados.

35

La alta sensibilidad de la presente invención hace de este procedimiento una herramienta excelente para diferenciar entre infección activa, infección latente, infección reciente, infección en un niño/recién nacido y/o infección latente a largo plazo. De este modo en una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento en el que una respuesta de IP-10 dependiente de antígeno por encima del nivel de referencia conjuntamente con una nula indica que el mamífero tiene una infección activa, una infección latente, una infección reciente, y/o una infección latente a largo plazo.

40

En otra realización la presente descripción se refiere a un procedimiento donde se reduce la cantidad de material de muestra (por ejemplo sangre entera) usado en el ensayo. En el caso de sangre entera disminuye al intervalo de 3 a 0,1 ml, y en el caso de PBMC el número de células está en el intervalo de 1×10^6 a $0,05 \times 10^6$. Este "mini ensayo" adecuado para pacientes con bajo volumen de sangre (especialmente niños/bebés o pacientes con anemia) es innovador debido a que puede diagnosticar una enfermedad (por ejemplo tuberculosis) sin consecuencias hemodinámicas para el donante o realizarse sobre un material de muestra muy escaso por ejemplo células del líquido de la médula espinal, líquido pleural o sangre del cordón umbilical.

45

Combinación con otros marcadores

50 La medición de IP-10 junto con uno o más de los siguientes marcadores puede reducir el número de falsos positivos e incrementar el poder discriminador. De este modo, en una realización, el procedimiento además comprende,

- a) determinar el nivel de IP-10 y MCP-1 en respuesta a la estimulación antigénica,
- b) combinar el nivel determinado de IP-10 y MCP-1, y
- c) comparar dicho nivel combinado con un nivel de referencia combinado.

5 Como entenderán los expertos en la técnica el nivel de referencia combinado se determina mediante medición del nivel de IP-10 y cualquiera de los marcadores combinatorios sugeridos tales como el nivel de MCP-1 en una población sana, pero sin limitarse a ellos, y combinar dicho nivel de IP-10 y MCP-1 determinado mediante una aritmética tal como la adición, pero sin limitarse a ella. El nivel de referencia combinado se determina en un punto de corte seleccionado con relación a la distribución del nivel de referencia combinado por ejemplo media + 2 desviaciones estándar en una población sana o mediante otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

10 Los marcadores combinatorios adicionales comprenden IL-2 y INF- γ .

En una realización, la presente invención describe un procedimiento que además comprende

- a) determinar el nivel de INF- γ y opcionalmente MCP-1 y/o IL-2 en respuesta a la estimulación antigénica,
- b) combinar el nivel determinado de IP-10 and INF- γ y opcionalmente MCP-1 y/o IL-2, y
- c) comparar dicho nivel combinado con un nivel de referencia combinado.

15 En una realización, el procedimiento comprende,

- a) determinar el nivel de IP-10 en respuesta a la estimulación antigénica,
- b) comparar el nivel de IP-10 con un nivel de referencia o un valor derivado del mismo
- c) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo ha generado reactividad de IP-10 al antígeno

20 d) determinar el nivel de MCP-1 en respuesta a la estimulación antigénica,

e) comparar el nivel de MCP-1 con un nivel de referencia o un valor derivado del mismo

f) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo ha generado reactividad de MCP-1 al antígeno

g) combinar la reactividad de IP-10 determinada y la reactividad de MCP-1

25 determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno y de este modo ha generado reactividad inmunológica al antígeno con al menos un biomarcador.

En una realización, el procedimiento comprende,

- a) determinar el nivel de IP-10 en respuesta a la estimulación antigénica,
- b) comparar el nivel de IP-10 con un nivel de referencia o un valor derivado del mismo

30 c) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo genera reactividad de IP-10 al antígeno

d) determinar el nivel de IL-2 en respuesta a la estimulación antigénica,

e) comparar el nivel de IL-2 con un nivel de referencia o un valor derivado del mismo

35 f) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo genera reactividad de IL-2 al antígeno

g) combinar la reactividad de IP-10 determinada y la reactividad de IL-2

determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno y de este modo generan reactividad inmunológica al antígeno con al menos un biomarcador

40 En una realización, el procedimiento comprende,

- a) determinar el nivel de IP-10 en respuesta a la estimulación antigénica,
- b) comparar el nivel de IP-10 con un nivel de referencia o un valor derivado del mismo
- c) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo genera reactividad de IP-10 al antígeno
- 5 d) determinar el nivel de IFN- γ en respuesta a la estimulación antigénica,
- e) comparar el nivel de IFN- γ con un nivel de referencia o un valor derivado del mismo
- f) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo genera reactividad de IFN- γ al antígeno
- g) combinar la reactividad de IP-10 determinada y la reactividad de IFN- γ
- 10 determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno y de este modo genera reactividad inmunológica al antígeno con al menos un biomarcador

En una realización, el procedimiento comprende,

- a) determinar el nivel de IP-10 en respuesta a la estimulación antigénica,
- b) comparar el nivel de IP-10 con un nivel de referencia o un valor derivado del mismo
- 15 c) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo genera reactividad de IP-10 al antígeno
- d) determinar el nivel de INF- γ y/o MCP-1 y/o IL-2 en respuesta a la estimulación antigénica,
- e) comparar el nivel de INF- γ y/o MCP-1 y/o IL-2 con los niveles de referencia para cada biomarcador o valores derivados de los mismos
- 20 f) determinar si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho antígeno y de este modo genera reactividad de INF- γ y/o MCP-1 y/o de IL-2 al antígeno
- g) combinar la reactividad de IP-10 determinada y/o INF- γ y/o MCP-1 y/o reactividad de IL-2

determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno y de este modo genera reactividad inmunológica al antígeno con al menos uno de los biomarcadores examinados

25 Diagnosis

En una realización, y como se ha establecido previamente, IP-10 se puede usar para diagnóstico de sujetos sospechosos de diversos estados patológicos, tales como infecciones. Cuando se usan en diagnóstico el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede ayudar a determinar la presencia de estados inmunológicos, tales como infecciones, usualmente llevados a cabo mediante evaluación de síntomas clínicos y ensayos de laboratorio adicionales. El ensayo puede diagnosticar diversas fases de infección es decir, una infección encontrada recientemente en un individuo sin ningún síntoma, una infección encontrada muchos años antes en un individuo sin síntomas de esa infección, una infección activa donde el paciente presenta síntomas debidos a la infección.

En otra realización IP-10 se puede usar para diagnóstico de sujetos sospechosos de tuberculosis (por ejemplo infección activa, latente o reciente de TB) y en particular pacientes con riesgo creciente de progresión de tuberculosis latente a activa es decir, pacientes que reciben medicación inmunosupresora (es decir, tratamiento con anticuerpos monoclonales (anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo Rituximab®) o tratamiento de bloqueo de TNF- α (por ejemplo Remicade®, Enbrel®, Humira®)) o esteroides o quimioterapia de cáncer; o, pacientes que padecen afecciones inmunosupresoras (por ejemplo infección de VIH, cáncer, IDDM o diabetes mellitus no insulina dependiente (NIDDM), afecciones autoinmunes, malnutrición, ancianos, uso de fármacos intravenosos (IVDU) o trastornos inmunes hereditarios), y en individuos que se han infectado recientemente. De hecho siguiendo las directrices estándar estos pacientes se deben examinar para detectar la presencia de TB activa, latente o reciente antes del inicio del tratamiento médico.

Actualmente se recomienda encarecidamente examinar pacientes que sean candidatos para tratamiento de bloqueador de TNF- α o que sean VIH positivos con TST o un ensayo de M. tuberculosis específico de antígeno. Ya que los estudios

han demostrado que estos ensayos pueden ser poco fiables en las categorías de los pacientes anteriormente mencionados, IP-10 es un mejor candidato debido a su mayor sensibilidad.

En otra realización la IP-10 se puede usar para examinar individuos sospechosos de infección por Chlamydia (por ejemplo infección urogenital, infección pélvica y/o infección en el ojo).

- 5 La presente invención permite la combinación de antígenos de diversos agentes infecciosos que o bien colonizan el mismo órgano o región anatómica, o generan un grupo común de síntomas. Mediante la combinación de diferentes antígenos específicos puede ser posible seleccionar pacientes de riesgo o excluir patógenos comunes que generan afecciones indistinguibles clínicamente tales como infección urogenital; o que son susceptibles para el mismo tratamiento por ejemplo antibióticos.
- 10 De este modo, en una realización la presente descripción se refiere a un procedimiento para determinar la presencia de manera simultánea de al menos dos enfermedades infecciosas que comprende
- a) obtener una muestra de un paciente que lo necesita y dividir dicha muestra en al menos dos fracciones
- b) estimular una fracción con antígenos, en la que dichos antígenos están relacionados con agente(s) infeccioso(s) específico(s) seleccionado(s) para evaluación (fracción de respuesta) incubando la segunda fracción de la muestra con una solución inactiva (fracción nula)
- 15 c) medir el nivel de IP-10 en ambas fracciones
- d) determinar el nivel de IP-10 dependiente de antígeno de la muestra restando el nivel de IP-10 determinado en la fracción nula de la IP-10 determinada de la fracción de respuesta
- e) comparar dicho nivel de IP-10 dependiente de antígeno determinado con un nivel de referencia para al menos uno de los agentes infecciosos seleccionados, y
- 20 f) referirse a dicho paciente que lo necesita como infectado con al menos uno de los agentes infecciosos seleccionados si el nivel de IP-10 dependiente de antígeno es mayor que el nivel de IP-10 en la fracción de referencia.
- De acuerdo con lo anterior los procedimientos de la presente descripción pueden ser aplicables para examinar a personas con alto riesgo de enfermedades infecciosas, por ejemplo personas que han estado o han viajado a través de áreas endémicas de enfermedad.
- 25 De este modo, en una realización de la presente descripción las enfermedades infecciosas se seleccionan entre el grupo que consta de malaria, tuberculosis, meningitis, encefalitis japonesa, cólera, leishmanina, dengue y polio.
- En otra realización de la descripción las enfermedades infecciosas se seleccionan entre las enfermedades de transmisión sexual que consisten en chancro, infección por Chlamydia, gonorrea, linfogranuloma venéreo, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Treponema pallidum, hepatitis B, virus del Herpes simplex, virus de la inmunodeficiencia humana, papilomavirus humano, Molluscum, Phthirus pubis, Sarcoptes scabiei y Trichomonas vaginalis.
- 30 En otra realización más de la descripción, las enfermedades infecciosas se seleccionan entre el grupo que consta de agentes infecciosos gastrointestinales tratables por ejemplo bacterias *Shigella*, *E. Coli*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*, bacterias *Salmonella* y bacterias *Salmonella typhi*.
- 35 En otra realización más de la descripción las enfermedades infecciosas se seleccionan entre el grupo que consta de agentes infecciosos gastrointestinales no tratables con antibióticos por ejemplo rotavirus, norovirus, adenovirus, sapovirus, y astrovirus.
- En una realización adicional de la descripción las enfermedades infecciosas se seleccionan entre el grupo que consta de enfermedades relacionadas con la sangre que son sujeto de examen por ejemplo en bancos de sangre: hepatitis A, hepatitis E, malaria, enfermedad de Chagas, babesiosis, leishmaniasis, virus espumoso de los Simios, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (vCJD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), citomegalovirus (CMV) y virus Epstein-Barr.
- 40 En una realización de la descripción las enfermedades infecciosas se seleccionan entre el grupo que consta de bacterias capaces de provocar meningitis bacteriana, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Haemophilus influenzae*.
- 45

De acuerdo con lo anterior es objeto de la presente invención hacer una diagnosis específica de la especie, ya que la selección de un antígeno específico permite a los expertos en la técnica diferenciar entre diversas especies por ejemplo Mycobacterium.

Pronóstico

5 En una realización, IP-10 se puede usar para predecir el pronóstico de sujetos diagnosticados con diversos estados patológicos, tales como infecciones. Cuando se usa en el pronóstico de pacientes, el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede ayudar a predecir el curso y el resultado probable de los estados inmunológicos, tales como infecciones, ayudando de este modo a los expertos en la técnica en la selección del procedimiento de tratamiento apropiado y predecir el efecto de un cierto tratamiento para la afección.

10 Seguimiento

En una realización, IP-10 se puede usar para hacer el seguimiento de los sujetos diagnosticados con infecciones. Cuando se usa en el seguimiento de pacientes el procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede ayudar a determinar la eficacia de tratamiento durante y después de la terminación de tratamiento por ejemplo seguimiento y predicción de la recurrencia posible de la infección.

15 La posibilidad de hacer un seguimiento de la eficacia de la terapia mediante la presente descripción es particularmente relevante debido a que (usando la infección con *M. tuberculosis* como un ejemplo)

a) es fácil realizar por una simple extracción de sangre en lugar de los procedimientos actualmente disponibles como microscopía de esputos, cultivo de Mycobacterium, rayos X u otros procedimientos

20 b) es más reproducible comparado con la microscopía de esputos, cultivo de Mycobacterium, rayos X u otros procedimientos

c) es económico, comparado con la microscopía de esputos, cultivo de Mycobacterium, rayos X u otros procedimientos, los procedimientos de cirugía invasiva implicados en una biopsia, por ejemplo si se sospecha de una tuberculosis extrapulmonar, o una broncoscopia, si el paciente da negativo en esputo

25 d) es más sensible comparado con los ensayos de IFN- γ para tuberculosis basados en superposición de péptidos de RD1;

e) puede distinguir entre tuberculosis activa y latente mientras que los otros ensayos inmunes solamente distinguen infección o no infección.

Selección

30 En una realización, el procedimiento de acuerdo con la presente descripción se usa para propósitos de seleccionar para un examen. Es decir, se usa para evaluar sujetos sin una diagnosis anterior de infecciones midiendo el nivel de IP-10 de acuerdo con la descripción y correlacionando el nivel medido a un nivel especificado previamente, que indica la presencia o ausencia de diversas infecciones (por ejemplo infección con *M. tuberculosis*). En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la presente descripción se usa para propósitos de seleccionar para un examen. Es decir, se usa para evaluar sujetos sin una diagnosis previa de infecciones pero en riesgo de reactivación de enfermedad latente midiendo el nivel de IP-10 de acuerdo con un nivel especificado previamente correlacionando el nivel medido con la presencia o ausencia de diversas infecciones (por ejemplo infección con *M. tuberculosis*).

Como se ha establecido previamente la presente descripción describe un procedimiento para examinar y detectar de manera simultánea al menos dos enfermedades infecciosas.

40 En otra realización de la presente descripción, el procedimiento se puede usar para examinar sangre de donantes de sangre en busca de diversas enfermedades tales como, pero sin limitarse a ellas, infección (infecciones) provocada(s) por, por ejemplo, parásitos o virus.

Rastreo de contactos

45 En realizaciones preferidas, IP-10 se puede usar para diagnosis de sujetos expuestos a diversas infecciones, tales como con *M. tuberculosis*. Cuando se usa en rastreo de contacto el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede ayudar a determinar la presencia de infecciones, tal como infección con *M. tuberculosis*.

En otras realizaciones, IP-10 se puede usar para diagnosis de sujetos expuestos a casos contagiosos en brotes de infecciones altamente contagiosos, tales como, pero sin limitarse a ellas, tuberculosis, virus Corona (por ejemplo

Síndrome Respiratorio Adquirido Severo), virus de la gripe,, Ebola o Marburg. En el caso de tuberculosis: cuando se usa en el rastreo de los contactos el procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede ayudar a determinar la presencia de una infección, usualmente llevada a cabo mediante la evaluación de TST o el ensayo de liberación de IFN- γ y actualmente disponibles.

5 Hallazgo de caso potenciado

En realizaciones preferidas, IP-10 se puede usar para la diagnosis de diversas enfermedades, tales como infecciones. Cuando se usa en el hallazgo de casos potenciados, el procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede ayudar a determinar la presencia de infecciones tales como, pero sin limitarse a ellas, TB de microscopía negativa que es de otra manera difícil de diagnosticar debido a la carencia de evidencia microbiológica de infección pero que se lleva a cabo usualmente mediante evaluación de los síntomas clínicos, respuesta a tratamiento y carencia de diagnosis alternativas o mediante ensayos que requieren mucho tiempo (semanas) tal como cultivo de esputos.

Estudios de prevalencia

En realizaciones preferidas, IP-10 se puede usar para estudiar la prevalencia de diversos estados inmunológicos tales como, pero sin limitarse a ellos, infecciones en poblaciones de interés tales como niños, inmigrantes VIH positivos, refugiados, trabajadores de atención sanitaria, niños en edad escolar, reclusos, técnicos de laboratorio. Cuando se usa en estados de prevalencia, el procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede ayudar a determinar la presencia de una infección, tal como TB latente y activa en una población, usualmente llevado a cabo por TST.

Fines de investigación

En una realización, instituciones de investigación pueden usar IP-10 cuando se hacen ensayos para detectar nuevos antígenos potenciales procedentes de un microorganismo seleccionado entre el grupo que consta de mycobacterias, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, Listeria, enterococos, Neisseria, Vibrio, Treponema (sífilis), Borrelia, Leptospiræ, Chlamydia, retrovirus (SIV, VIH-1 y VIH-2), virus Corona tal como Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) y NL-63, Cytomegalovirus, rotavirus, metapneumovirus, virus sincitial respiratorio (RSV), poxvirus, virus Epstein barr, enterovirus, morbillivirus, rhabdovirus (rabia), Rubivirus (rubeola), flavivirus (dengue, fiebre amarilla), virus herpes, virus varicela-zoster, hepatitis C y B, Leishmania, Toxoplasma gondii, tripanosoma, Plasmodium (falciparum, vivax, ovale, malaria), Pneumocystis carinii (PCP) y diversos nematodos, trematodos, estos antígenos pueden ser por ejemplo lípidos, moléculas de polisacárido, proteínas y péptidos. Cuando se usa para propósitos de investigación de laboratorio el procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede ayudar a determinar reactividad inmune al antígeno examinado, proteína o péptido aplicable en el desarrollo de vacunas y ensayos de diagnóstico.

Varias moléculas de antígeno como por ejemplo péptidos se identifican como especies específicas o específicas de enfermedad, pero su capacidad para inducir la reactividad de células T in vivo es difícil determinar debido a la falta de marcadores sensibles. La IP-10 determinada después de la estimulación con tales antígenos candidatos se puede usar para buscar e identificar nuevos antígenos o moléculas potencialmente interesantes. Más específicamente en el caso de antígenos procedentes de M. tuberculosis, C. trachomatis, VIH-1 or VCH; las instituciones de investigación pueden usar IP-10 cuando se ensaya la inmunogenicidad de estos antígenos es decir, como una medida de la reactividad de las células T para el desarrollo de por ejemplo vacunas.

Efecto del tratamiento

Los presentes inventores proponen que el ensayo repetido de las descargas espontáneas durante la incubación (muestra nula) y de IP-10 inducida por antígeno (muestra Ag), se puede usar durante el tratamiento como marcador para el efecto del tratamiento. Si las respuestas de IP-10 espontánea disminuyen durante el tratamiento se puede considerar que ha tenido éxito, mientras, si no se observa disminución se puede sospechar que el tratamiento ha fallado.

Los presentes inventores proponen que el ensayo repetido de IP-10 espontánea e inducida por antígeno durante por ejemplo el tratamiento de TB, se puede usar como marcador del efecto del tratamiento. Si las respuestas de IP-10 estimuladas por antígeno disminuyen durante el tratamiento se puede considerar que ha tenido éxito, mientras que si no se observa disminución de se puede sospechar que el tratamiento ha fallado.

Se debe entender que cualquier característica y/o aspecto descrito en el presente documento junto con la determinación de acuerdo con la descripción se aplican por analogía a la "diagnosis", el "pronóstico", el "seguimiento", la "selección", el "examen", los "fines de investigación", el "rastreo de contactos", el "hallazgo de caso potenciado" y los "estudios de prevalencia" de acuerdo con la descripción y viceversa.

50

Etapas de incubación

5 Las células del sistema CMI pierden la capacidad de dar una respuesta de CMI en sangre entera al cabo de de amplios períodos después de la extracción de sangre del sujeto, y las respuestas sin intervención a menudo están reducidas o ausentes severamente 24 horas después de la extracción de sangre, si no se tratan de una manera que prolongue la vida de las células tal como, pero sin limitarse a ello, la conservación a una temperatura por encima de 10 ° Celsius.

10 En una realización la reducción de trabajo permite realizar la estimulación de las muestra con antígenos en los mismos centros de atención tales como consultorios de médicos, clínicas, ambulatorios y clínicas veterinarias o en granjas. Una vez que se ha completado la estimulación del antígeno, ya no se requieren células frescas o activas. La IP-10 y otros biomarcadores tales como citoquinas o moléculas de efectores inmunes son estables en plasma y, de este modo, la muestra se puede almacenar, congelar o transportar sin condiciones especiales o requerimientos de un tiempo rápido de una manera similar a las muestras de plasma estándar usadas para diagnóstico de otras enfermedades infecciosas u otra enfermedad.

15 La etapa de incubación puede ser de entre 5 y 144 horas, más preferiblemente de 5 a 120 horas e incluso más preferiblemente de 12 a 24 horas o un período de tiempo intermedio. De este modo en una realización de la presente descripción el tiempo de incubación es de 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 26 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, o 144 horas.

20 Debido a que la IP-10 se secreta en concentraciones tan altas, es posible incubar las muestras fuera del incubador es decir, en la mesa en el laboratorio o en un baño de agua con temperatura estable o en un dispositivo de transporte portátil. Esto puede ser especialmente útil en los países en vías de desarrollo o en ambulatorio con instalaciones de laboratorio básicas.

25 La etapa de incubación puede tener lugar a una temperatura que varía entre 20 ° y 43 ° Celsius. De este modo, en una realización de la presente descripción la temperatura de incubación puede ser de 16 ° Celsius, 18 ° Celsius, 20 ° Celsius, 22 ° Celsius, 25 ° Celsius, 26 ° Celsius, 27 ° Celsius, 28 ° Celsius, 29 ° Celsius, 30 ° Celsius, 31 ° Celsius, 32 ° Celsius, 33 ° Celsius, 35 ° Celsius, 37 ° Celsius, 38 ° Celsius, 39 ° Celsius, 40 ° Celsius o 41 ° Celsius.

La etapa de incubación se puede realizar a una temperatura no fija pero no limitada a entre 15 ° y 40 ° Celsius, más preferiblemente entre 18 ° y 37 ° Celsius e incluso más preferiblemente entre 30 ° y 37 ° Celsius

Una realización de la descripción permite realizar la estimulación de la muestra en dilución con adición de medios de cultivo al cultivo de células.

30 Otra realización de la descripción permite realizar la estimulación de la muestra con la adición de líquido inerte de dilución (por ejemplo solución salina) al cultivo de células.

Muestra

35 Una realización de la presente descripción contempla un procedimiento para medir una respuesta de CMI en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la recogida de una muestra de dicho sujeto en la que dicha muestra comprende células del sistema inmune, que son capaces de producir moléculas de efector inmune después de la estimulación por un antígeno, incubando dicha muestra con un antígeno y midiendo después la presencia o el aumento del nivel de una molécula de efector inmune en donde la presencia o el nivel de dicha molécula de efector inmune es indicativa de la capacidad de dicho sujeto para producir una respuesta inmune mediada por células.

40 En una realización la muestra proviene del grupo que consta de sangre, orina, líquido pleural, líquido bronquial, lavados orales, biopsias de tejidos, ascitis, pus, líquido cefalorraquídeo, aspirado y líquido folicular.

En una realización preferida la muestra proviene de sangre.

Sin embargo la muestra puede también comprender células seleccionadas entre el grupo que consta de sangre entera, células mononucleares de líquido pleural, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T, células T CD4, células T CD8, células T gamma-delta, monocitos, macrófagos y células NK.

45 De manera conveniente, cuando la muestra es sangre entera, el tubo de recogida de sangre se trata con anticoagulante (por ejemplo heparina). No obstante que la sangre entera es la muestra preferida y más conveniente, la presente descripción se extiende a otras muestras que contienen células inmunes tales como, pero sin limitarse a ellas, líquido pleural, líquido de ascitis, líquido linfático, líquido espinal o cerebral, líquido de tejidos y líquido respiratorio que incluye líquido nasal y pulmonar.

En una realización la presente descripción de este modo se refiere a un procedimiento, en el que la muestra proviene de sangre, orina, líquido pleural, líquido bronquial, lavados orales, biopsias de tejidos, líquido de ascitis, pus, líquido cefalorraquídeo, aspirado, y/o líquido folicular.

5 En otra realización la presente descripción de este modo se refiere a un procedimiento, en el que la muestra comprende células seleccionadas entre el grupo que consta de células mononucleares periféricas, células T, células T CD4, células T CD8, células T gamma-delta, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células NK.

En una realización, la muestra es sangre entera, que se puede recoger en tres recipientes adecuados en los que antígeno, mitógeno o "nula" están presentes. En otra realización, antígenos, mitógeno o "nula" se puede añadir después a alícuotas que contienen la muestra, por ejemplo sangre entera.

10 En otra realización, la muestra es sangre entera que se puede recoger en tubos de recogida que contienen el antígeno, mitógeno o "nula" o alícuotas de sangre entera al que se añade antígeno, mitógeno o nula.

En general, la sangre se mantiene en presencia de un anticoagulante (preferiblemente heparina, como alternativa por ejemplo citrato o EDTA). El anticoagulante está presente en el tubo de recogida de sangre cuando se añade la sangre. El uso de tubos de recogida de sangre es preferiblemente pero no necesariamente compatible con sistemas de laboratorio automáticos estándar, que son capaces de análisis a gran escala y muestreo de acceso al azar. Los tubos de recogida de sangre también minimizan los costes de manipulación y reducen la exposición en laboratorio a sangre entera y plasma y, por lo tanto, reducen el riesgo del personal de laboratorio de contraer un agente patógeno tal como, pero sin limitarse al mismo, virus de inmunodeficiencia humana.

20 Las alícuotas de sangre entera pueden tener volúmenes que varían entre 10 µl - 4000 µl, tales como los siguientes pero sin limitarse a ellos, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, 1000 µl, 1100 µl, 1200 µl, 1300 µl, 1400 µl, 1500 µl, 1600 µl, 1700 µl, 1800 µl, 1900 µl, 2000 µl, 2100 µl, 2200 µl, 2300 µl, 2400 µl, 2500 µl, 2600 µl, 2700 µl, 2800 µl, 2900 µl o 3000 µl.

La muestra se puede incubar en tubos, pocillos de cultivo de tejidos u otros recipientes y se puede añadir antígeno, mitógeno y "nula" en concentraciones relevantes.

25 Un tubo de recogida de sangre incluye un tubo Vacutainer u otro recipiente similar, pero la sangre también se puede extraer directamente en un tubo abierto o tubo capilar.

Kit

30 La presente descripción además contempla un kit para evaluar la capacidad del sujeto para producir una respuesta mediada por células. El kit de manera conveniente tiene forma de compartimientos con uno o más compartimientos adaptados para recibir una muestra de un sujeto tal como células purificadas de sangre entera, biopsias u otro material. Ese compartimiento u otro compartimiento también se puede adaptar para que contenga heparina donde la muestra es sangre entera.

35 En general, el kit es una forma que está envasada para venta con un conjunto de instrucciones. Las instrucciones estarían en general en la forma de un procedimiento para medir una respuesta de CMI en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la recogida de una muestra de dicho sujeto en el que dicha muestra comprende células del sistema inmune que son capaces de producir moléculas efectoras inmunes después de la estimulación por un antígeno, incubando dicha muestra con un antígeno suministrado con el kit y después medir la presencia o la elevación del nivel de IP-10, siendo la presencia o el nivel de dicha molécula efectora inmune indicativa de la capacidad de dicho sujeto para producir una respuesta inmune mediada por células.

40 En una realización el kit contiene antígeno y anticuerpos monoclonales o policlonales, que reacciona específicamente con IP-10 en un inmunoensayo, o fragmentos de unión específica de dichos anticuerpos para uso como un reactivo de diagnóstico.

45 El kit contemplado de la presente descripción puede tener forma de multicomponente en el que el primer componente comprende una multiplicidad de tubos de recogida de sangre, un segundo componente comprende un medio de detección basado en anticuerpos para una molécula efectora inmune y un tercer componente comprende un conjunto de instrucciones, comprendiendo dichas instrucciones lo siguiente: (i) recoger sangre en los tubos de recogida de sangre; (ii) mezclar los tubos; (iii) incubar los tubos; (iv) centrifugar los tubos y recoger el plasma; y (v) detectar las moléculas efectoras inmunes en plasma.

50 El ensayo también puede ser automático o semiautomático y los aspectos automáticos se pueden controlar mediante un software de ordenador.

El ensayo de la presente descripción puede automatizarse o semiautomatizarse para conseguir un alto rendimiento de búsqueda de varios efectores inmunes de un sujeto. La automatización está de manera conveniente controlada por un software de ordenador. La presente descripción contempla, por lo tanto, un producto de programa informático para la determinación de la presencia o ausencia o del nivel de IP-10, comprendiendo dicho producto

- 5 (1) código que recibe, como valor de entrada, la identidad de una molécula indicadora asociada a un anticuerpo o ARNm marcado
- (2) código que compara dichos valores de entrada con los valores de referencia para determinar el nivel de moléculas indicadoras y/o la identidad de la molécula a la que la molécula indicadora está unida; y
- (3) un medio de lectura por ordenador que almacena los códigos.
- 10 Otro aspecto más de la presente descripción se extiende a un ordenador para determinar la presencia o la ausencia o el nivel de IP-10, comprendiendo dicho ordenador:
- (1) un medio de almacenamiento de datos que puede leer una máquina que se compone de un material de almacenamiento de datos codificado con los datos que puede leer la máquina, en el que dichos datos que puede leer la máquina comprenden valores de entrada que identifican una molécula indicadora asociada a un anticuerpo o ARNm marcado;
- 15 (2) una memoria de trabajo para almacenar instrucciones para dichos datos que pueden leer la máquina,
- (3) una unidad de procesamiento central acoplada a dicha memoria de trabajo y a dicho medio de almacenamiento de datos que puede leer la máquina, para procesar dichos datos que puede leer la máquina para comparar dichos valores para proporcionar una valoración de la identidad o del nivel de moléculas indicadoras o de moléculas a las que están unidas y
- 20 (4) un hardware de salida acoplado a dicha unidad de procesamiento central, para recibir los resultados de la comparación.

Especificidad y sensibilidad

25 La sensibilidad de cualquier ensayo de diagnóstico dado define la proporción de individuos con una respuesta positiva que están correctamente identificados o diagnosticados por el ensayo, por ejemplo la sensibilidad es del 100 %, si todos los individuos con una afección dada tienen un ensayo positivo. La especificidad de un ensayo de detección dado refleja la proporción de individuos sin la afección que están correctamente identificados por el ensayo, por ejemplo el 100 % de especificidad si todos los individuos sin la afección tienen un resultado de ensayo negativo.

30 La sensibilidad se define como la proporción de individuos con una afección dada (por ejemplo infección de TB activa), que están correctamente identificados por los procedimientos descritos de la invención (por ejemplo tienen un resultado de ensayo de IP-10 positivo).

Especificidad en el presente documento se define como la proporción de individuos sin la afección (por ejemplo infección de TB activa), que están correctamente identificados por los procedimientos descritos de la invención (por ejemplo tienen un resultado de ensayo de IP-10 negativo)

35 Características de funcionamiento del receptor

La precisión de un ensayo de diagnóstico se describe mejor por las características de funcionamiento de su receptor (ROC) (véase especialmente Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561 - 577). El gráfico ROC es una representación gráfica de todos los pares de especificidad y sensibilidad que se producen al variar de manera continua el umbral de decisión sobre el intervalo entero de los datos observados.

40 La realización clínica de un ensayo de laboratorio depende de su precisión diagnóstica o de la capacidad para clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la capacidad de los ensayos para distinguir correctamente dos estados diferentes de los sujetos investigados. Tales estados son por ejemplo sanos y enfermos, infección latente o reciente o frente a infección, o enfermedad benigna frente a maligna.

45 En cada caso, la representación gráfica de ROC muestra el solapamiento entre las dos distribuciones mediante representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad - 1 para el intervalo completo de los umbrales de decisión. En el eje y está la sensibilidad, o la verdadera fracción positiva [definida como (número de resultados de ensayo falso negativos) (número de resultados de ensayo verdaderos positivos + número de falsos negativos)]. Esto también se ha referido como una positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula solamente a partir

del subgrupo afectado. En el eje x axis está la fracción falso positiva, o especificidad - 1 [definida como (número de resultados falso positivos) / (número de resultados verdaderos negativos + número de falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula completamente a partir del subgrupo no afectado.

5 Debido a que las fracciones verdaderas y falso positivas se calculan completamente por separado, mediante el uso de los resultados de ensayo de los dos diferentes subgrupos, la representación gráfica de ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de representación gráfica de ROC representa un par de sensibilidad/ especificidad que corresponde a un umbral de decisión particular. Un ensayo con la discriminación perfecta (no superposición en las dos distribuciones de los resultados) tiene una representación gráfica de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, donde la fracción verdadera positiva es 1,0, o el 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción falso positiva es 0 (especificidad perfecta). La representación gráfica teórica para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina derecha superior. La mayoría de las representaciones gráficas se quedan entre estos dos extremos. (Si la representación gráfica de ROC cae completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se remedia fácilmente mediante la inversión del criterio para "positividad" desde "mayor que" a "menos de" o vice versa.) De manera cuantitativa, cuanto más próxima está la representación gráfica a la esquina superior izquierda, mayor es la precisión del ensayo.

20 Un objetivo conveniente para cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo es expresar su comportamiento mediante un único número. La medición global más común es el área bajo la representación gráfica de ROC. Por conveniencia, este área es ya $\geq 0,5$ (y si no, se puede invertir la regla de decisión para hacerlo de esta manera). Los valores varían entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución evidente entre los dos grupos de valores de ensayo). El área no depende solamente de una parte particular de la representación gráfica tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90 % de especificidad, sino de la representación gráfica entera. Esta es una expresión cuantitativa, descriptiva de cómo aproximar la representación gráfica de ROC a la perfecta (área = 1,0).

25 La utilidad clínica del marcador novedoso IP-10 se puede valorar comparándolo y combinándolo con otras herramientas de diagnóstico para la infección dada. En el caso de infección con *M. tuberculosis* la utilidad clínica de marcador novedoso IP- 10 se puede valorar en comparación con las herramientas de diagnóstico establecidas, el marcador establecido IFN- γ o el TST usando un análisis de curva de operador de receptor. Véase el ejemplo 5.

30 De este modo, es un objeto de realizaciones de la presente descripción proporcionar un procedimiento inmunológico para detectar si un mamífero ha encontrado un antígeno, comprendiendo el procedimiento:

- a) determinar el nivel de producción de IP-10 específica de antígeno en una muestra de dicho mamífero
- b) construir una representación gráfica de percentiles de IP-10 obtenida de una población sana
- c) construir una curva de ROC (características de funcionamiento del receptor) basada en el nivel de IP-10 determinado en la población sana y en el nivel de IP-10 determinado en una población que ha generado reactividad inmunológica para el antígeno en cuestión
- 35 d) seleccionar una especificidad deseada
- e) determinar a partir de la curva de ROC la sensibilidad correspondiente a la especificidad deseada
- f) determinar a partir de la representación gráfica de percentiles el nivel de IP-10 correspondiente a la sensibilidad determinada; y
- 40 g) predecir el individuo que tenga reactividad inmunológica al antígeno, si el nivel de IP-10 en la muestra es igual a o mayor que dicho nivel de IP-10 correspondiente a la especificidad determinada y predecir si el individuo tiene o no probabilidad de reactividad inmunológica al antígeno si el nivel de IP-10 en la muestra es menor que dicho nivel de IP-10 total correspondiente a la especificidad determinada.

45 De este modo, es otro objeto de realizaciones preferidas de la presente descripción proporcionar un procedimiento inmunológico para detectar si un mamífero ha encontrado un antígeno, comprendiendo el procedimiento:

- a) determinar el nivel de producción de IP-10 específica de antígeno en una muestra de dicho mamífero
- b) construir una representación gráfica de percentiles de IP-10 obtenida de una población sana

- c) construir una curva de ROC (características de funcionamiento del receptor) basada en el nivel de IP-10 determinado en la población sana y en el nivel de IP-10 determinado en una población que ha generado reactividad inmunológica al antígeno en cuestión
- d) seleccionar una especificidad deseada
- 5 e) determinar a partir de la curva de ROC la sensibilidad correspondiente a la sensibilidad deseada
- f) determinar a partir de la representación gráfica de percentiles el nivel de IP-10 correspondiente a la sensibilidad determinada; y
- 10 g) predecir si el individuo tendrá reactividad inmunológica al antígeno si el nivel de IP-10 en la muestra es igual a o mayor que dicho nivel de IP-10 correspondiente a la sensibilidad determinada y predecir si es probable o no que el individuo tenga reactividad inmunológica al antígeno si el nivel de IP-10 en la muestra es menor que dicho nivel de IP-10 total correspondiente a la especificidad determinada.
- 15 La especificidad del procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede estar entre el 70 % y el 100 %, más preferiblemente el 80 % y el 100 %, más preferiblemente el 90 % y el 100 %. De este modo en una realización de la presente descripción la especificidad de la descripción es del 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- La sensibilidad del procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede estar entre el 70 % y el 100 %, más preferiblemente el 80 % y el 100 %, más preferiblemente el 90 % y el 100 %. De este modo en una realización de la presente descripción la sensibilidad de la descripción es del 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Véase el ejemplo 5.
- 20 El nivel de IP-10 se compara con un conjunto de datos de referencia o un valor de referencia de manera que el valor de corte para determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo incrementado o probabilidad de, por ejemplo, infección.
- Para incrementar la eficacia de la detección, el nivel de sangre de IP-10 se puede comparar con un conjunto de datos de referencia para determinar si el sujeto es probable que esté infectado o tenga mayor riesgo de desarrollar por ejemplo infección.
- 25 Para incrementar la eficacia de la detección, el nivel de IP-10 inducido por PHA y el nivel de IP-10 estimulado por antígeno se puede comparar con un conjunto de datos de referencia para determinar si el sujeto tiene la infección o tiene mayor riesgo de desarrollar infección o enfermedad.
- 30 Para determinar si el paciente tiene mayor riesgo de desarrollar por ejemplo infección, se debe establecer un corte. Este corte se puede lo establecer el laboratorio o el médico o establecerse en base a cada caso particular para cada paciente.
- De manera alternativa el punto de corte se puede determinar como la media, la mediana o la media geométrica del grupo de control negativo ((por ejemplo no infectado, no expuesto sano, pacientes sin infección de TB) +/- una o más desviaciones estándar o un valor derivado de la desviación estándar)
- 35 Después de la exposición al antígeno algunos individuos responden fuertemente a un biomarcador aunque no a otro. Por ejemplo algunos individuos pueden no mostrar ni respuestas de IP-10 ni IFN- γ , de este modo produciendo solamente bajos niveles de IP10 o IFN- γ . En estos casos la medición simultánea de dos, tres, cuatro o más biomarcadores incrementarán la sensibilidad del ensayo e incrementan el número de respuestas positivas. Mediante la combinación de IP-10 y uno o más biomarcadores tales como, pero sin limitarse a ellos, IFN- γ , IL-2, o MCP-1, es posible por lo tanto hacer predicciones de diagnóstico que sean menos vulnerables a una única anergia de biomarcador.
- 40 En otra realización preferida, las mediciones de IP-10 están combinadas con mediciones de uno más biomarcadores diferentes, y se comparan con un nivel de referencia combinado. Los niveles de biomarcador medidos se pueden combinar mediante operaciones aritméticas tales como suma, resta, multiplicación y manipulaciones aritméticas de porcentajes, raíz cuadrada, potenciación, y funciones logarítmicas. Diversas combinaciones de biomarcadores y diversos medios de calcular el valor de referencia combinado se pueden realizar mediante medios conocidos para los expertos en la técnica.
- 45 En otra realización preferida las mediciones individuales de biomarcadores (tales como. pero sin limitarse a ellos, IP-10 en combinación con IFN- γ y/o IL-2) se pueden combinar después que las concentraciones de biomarcadores individuales se comparen con un nivel de referencia, por ejemplo un punto de corte. Este planteamiento genera un resultado de ensayo que cubre no solamente varios antígenos sino también varios biomarcadores en uno. Diversas combinaciones de

biomarcadores y diversos medios de calcular el valor de referencia combinado se puede realizar mediante medios conocidos por los expertos en la técnica.

5 En una realización de la presente invención la combinación del biomarcador IP-10 y uno de los biomarcadores seleccionados entre el grupo que consta de MCP-1, IL-2 e INF- γ proporciona un efecto sinérgico en relación con la sensibilidad y/o especificidad.

En otra realización más de la presente invención la combinación del biomarcador IP-10, MCP-1 y IL-2 proporciona un efecto sinérgico en relación a la sensibilidad y/o la especificidad.

En una realización adicional de la presente invención la combinación del biomarcador IP-10, MCP-1 e INF- γ proporciona un efecto sinérgico en relación a la sensibilidad y/o la especificidad.

10 En otra realización de la presente invención la combinación del biomarcador IP-10, IL-2 e INF- γ proporciona un efecto sinérgico en relación a la sensibilidad y/o la especificidad.

15 De manera específica tal como se usa en el presente documento, sinergia se refiere al fenómeno en el que varios biomarcadores que actúan conjuntamente crean una "señal de biomarcador combinada" con mayor sensibilidad o especificidad para diagnosis, que la predicha por conocimiento solamente la sensibilidad o especificidad de biomarcadores separados, y de este modo reducen el número de falsos positivos e incrementan el poder discriminatorio.

20 En una lectura basada en anticuerpos tal como, pero sin limitarse a ella, ensayo ELISA o inmunocromatográfico con tiras reactivas, dos o más anticuerpos que se unen a diferentes biomarcadores serán capaces de una mayor unión de la cantidad total de biomarcador, actuando por lo tanto en sinergia y conduciendo a respuestas más fuertes y mayor sensibilidad en el ensayo. Se puede realizar una lectura combinada de acuerdo con las enseñanzas en el presente documento.

Valoración de riesgo

Los presentes inventores han identificado con éxito un nuevo marcador para medir una respuesta mediada por células a un antígeno. La concentración del marcador IP-10 aumenta en sujetos con una respuesta inmune mediada por células a un antígeno. Y IP-10 parece ser un marcador eficaz para la detección de por ejemplo infección con *M. tuberculosis*.

25 La sensibilidad es mayor que cualquier otro marcador establecido y la especificidad es comparable o mejor que con cualquier otro marcador establecido (véase por ejemplo el ejemplo 4, 5 y 10).

El razonamiento estadístico puede basarse por ejemplo en el riesgo de tener la enfermedad dependiendo de la edad, la ocupación, la exposición, los antecedentes genéticos, el tipo de HLA.

30 Los puntos de corte pueden variar basándose en condiciones específicas del individuo al que se hacen la pruebas tales como, pero sin limitarse a ellas, riesgo de tener la enfermedad, ocupación, residencia geográfica o exposición.

35 Los puntos de corte pueden variar basándose en condiciones específicas del individuo al que se hacen la pruebas tales como, pero sin limitarse a ellas, edad, sexo, antecedentes genéticos (es decir, tipo HLA), función inmune adquirida o heredada (por ejemplo infección por VIH, diabetes, pacientes con insuficiencia renal o hepática, pacientes en tratamiento con fármacos modificadores inmunes tales como, pero sin limitarse a ellos, corticoesteroides, quimioterapia, bloqueadores de TNF- α , inhibidores de mitosis).

La realización del ajuste de la decisión o el límite de corte determinará de este modo la sensibilidad del ensayo para detectar una infección, si está presente, o su especificidad para excluir la infección o enfermedad si está por debajo de este límite. Entonces el principio es que un valor por encima del punto de corte indica un mayor riesgo y un valor por debajo del punto de corte indica un riesgo reducido.

40 Además las muestras de ensayo con resultados indeterminados se deben interpretar de manera independiente. Los resultados indeterminados se definen como resultado con un nivel bajo no esperado de IP-10 en la muestra estimulada por mitógeno (PHA). El punto de corte final para un resultado de IP-10 indeterminado se puede decidir de acuerdo con el grupo de estudio, especialmente en individuos inmunosuprimidos el nivel de corte se puede seleccionar a un nivel más bajo.

45 Niveles de corte

Como en general entenderán los expertos en la técnica, los procedimientos para la búsqueda de reactividad inmune mediada por células son procesos de decisión que se hacen por comparación. Para cualquier procedimiento de toma de

decisión, son necesarios los valores de referencia basados en sujetos que tienen la enfermedad o afección de interés y/o sujetos que no tienen la enfermedad, infección, o afección de interés.

5 El nivel de corte (o el punto de corte) se puede basar en varios criterios incluyendo el número de sujetos que seguirían con pruebas de diagnóstico invasivas, el riesgo medio de tener y/o desarrollar por ejemplo infección para todos los sujetos que seguirían con las pruebas de diagnóstico invasivas adicionales, una decisión de que cualquier sujeto cuyo riesgo específico de paciente sea mayor de un cierto nivel de riesgo tal como por ejemplo 1 en 400 ó 1:250 (como se define por la organización de las pruebas de búsqueda del sujeto individual) deberá seguir con pruebas de diagnóstico invasivas adicionales u otros criterios conocidos por los expertos en la técnica.

10 El nivel de corte se puede ajustar basándose en varios criterios tales como, pero sin restringirse a ellos, un cierto grupo de individuos sometidos a pruebas. Por ejemplo el nivel de corte se puede establecer inferior en individuos con inmunodeficiencia y en pacientes con riesgo grande de progreso de la enfermedad activa, el corte puede ser mayor en grupos de individuos por lo demás sanos y con bajo riesgo de desarrollar enfermedad activa.

En una realización la presente descripción describe un procedimiento para determinar si un sujeto tiene una infección, que comprende:

15 (a) obtener del sujeto una muestra, y

(b) determinar cuantitativamente la concentración de IP-10 presente en la muestra, la presencia del polipéptido IP-10 presente en la muestra a una concentración igual o mayor que el corte seleccionado que indica que el sujeto es probable que tenga infección.

20 Más específicamente un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento inmunológico que comprende las etapas de

a) incubar una muestra obtenida de un mamífero con al menos un antígeno

b) determinar el nivel de IP-10 en dicha muestra

25 c) comparar dicho nivel de IP-10 determinado con un nivel de referencia, determinando por lo tanto si el mamífero previamente ha encontrado el antígeno que genera reactividad inmunológica al antígeno o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada inmunológica al antígeno.

Más específicamente otro aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento inmunológico que comprende las etapas de

a) incubar una muestra obtenida de un mamífero con al menos un antígeno sin ninguna estimulación posterior y con la condición de que el antígeno no sea PPD,

30 b) determinar el nivel de IP-10 en dicha muestra

c) comparar el nivel de IP-10 determinado con un nivel de referencia, determinando por lo tanto si dicho mamífero ha encontrado previamente dicho al menos un antígeno que genera reactividad inmunológica para dicho(s) antígeno(s) o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada inmunológica al (a los) antígeno(s).

35 En una realización, la presente descripción se refiere a un procedimiento de acuerdo con la presente descripción, en el que la muestra se divide en al menos 2 fracciones y

a) se incuba una muestra obtenida de un mamífero con al menos un antígeno sin ninguna estimulación posterior y con la condición de que el antígeno no sea PPD para generar una muestra de respuesta

b) se incuba la segunda fracción de la muestra con una solución inactiva para generar una muestra nula

c) se determina el nivel de IP-10 en las dos fracciones

40 d) se determina la respuesta dependiente de antígeno de IP-10 de la muestra restando el nivel de IP-10 determinado en la muestra nula de la IP-10 determinada en la muestra de respuesta

e) se compara la respuesta dependiente de antígeno de IP-10 o su valor derivado con el nivel de referencia o su valor derivado,

determinando por lo tanto si el mamífero ha encontrado previamente el antígeno y de este modo genera reactividad inmunológica al antígeno o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada inmunológica al antígeno y/o va a desarrollar infección.

5 El valor de discriminación es un valor que se ha determinado mediante la medición del parámetro o los parámetros tanto en una población de control sana como en una población con infección conocida, determinando por lo tanto el valor de discriminación que identifica la población infectada con una especificidad predeterminada o con una sensibilidad predeterminada basada en un análisis de la relación entre los valores de parámetro y los datos clínicos conocidos de la población de control sana y la población de pacientes con infección, tal como es evidente a partir de la descripción detallada en los ejemplos en el presente documento. El valor de discriminación determinado de esta manera es válido para el mismo sistema experimental en futuros ensayos individuales.

10 En los sistemas experimentales específicos descritos en el presente documento (ejemplo 5), el umbral de nivel de IP-10 útil como un valor de corte se encontró que estaba en el intervalo, pero sin limitarse al mismo, de 14 pg/ml a 1000 pg/ml. Preferiblemente el corte está en el intervalo entre 100 pg/ml y 800 pg/ml tal como en el intervalo de 100 - 600 por ejemplo en el intervalo de 150 - 400, tal como en el intervalo de 150 - 300, por ejemplo en el intervalo de 150 - 250, tal como en el intervalo de 175 - 215.

15 Preferiblemente el valor de corte es de 180 pg/ml, 181 pg/ml, 182 pg/ml, 183 pg/ml, 184 pg/ml, 185 pg/ml, 186 pg/ml, 187 pg/ml, 188 pg/ml, 189 pg/ml, 190 pg/ml, 191 pg/ml, 192 pg/ml, 193 pg/ml, 194 pg/ml, 195 pg/ml, 196 pg/ml, 197 pg/ml, 198 pg/ml, 199 pg/ml, 200 pg/ml, 201 pg/ml, 202 pg/ml, 203 pg/ml, 204 pg/ml, 205 pg/ml, 206 pg/ml, 207 pg/ml, 208 pg/ml, 209 pg/ml, 210 pg/ml, 211 pg/ml, 212 pg/ml, 213 pg/ml, 214 pg/ml, 215 pg/ml, 216 pg/ml, 217 pg/ml, 218 pg/ml, 219 pg/ml, 220 pg/ml, 221 pg/ml, 222 pg/ml, 223 pg/ml, 224 pg/ml o 225 pg/ml.

20 La dilución de la muestra, las mediciones combinadas con otros parámetros tales como, pero sin limitarse a ellos, interleucina-2, interferón gamma y/o proteína-1 quimiotáctica de macrófagos, u otros parámetros darán como resultado otros valores de corte, que se pueden determinar de acuerdo con las técnicas en el presente documento. Otros sistemas experimentales, otras muestras, otros antígenos, y otros parámetros darán de hecho como resultado otros valores de corte, que los pueden determinar de acuerdo con las enseñanzas en el presente documento los expertos en la técnica mediante procedimientos de diseño normales o experimentos rutinarios.

25 El nivel de biomarcador específico de antígeno inducido también depende de los antígenos elegidos para la estimulación. Algunos antígenos son inductores más potentes que otros, pero el número de antígenos disponibles diferentes es decir, péptidos, dará como resultado un mayor número de células que responden y una mayor producción de biomarcador. Por lo tanto un punto de corte también depende del antígeno y depende de la enfermedad. Además otras especies tienen otros repertorios de histocompatibilidad de antígeno principales y por lo tanto los mismos antígenos sometidos a ensayo en diferentes especies darán como resultado cortes específicos de la especie.

30 La mediciones de concentración de biomarcador se puede traducir en unidades internacionales (UI). UI se refiere a la actividad biológica del biomarcador y es una referencia para la evaluación comparativa entre diversos procedimientos de mediciones.

35 En otras realizaciones de la invención el valor de corte determinado se puede combinar con un índice de estimulación (definido como concentración de IP-10 estimulada por antígeno dividido por una concentración en plasma no estimulada).

40 Se encontró que un valor de índice de estimulación está en el intervalo, pero sin limitarse al mismo, de 1 a 6 o por encima. Preferiblemente, el índice de estimulación es al menos 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, o 4. La presente descripción incluso describe el valor de índice de estimulación en el intervalo de varios cientos de veces. De este modo, se contempla el valor de índice de estimulación de al menos 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, o incluso 1000.

45 El corte y el índice de estimulación pueden ser diferentes para infección latente, infección reciente, infección subclínica o infección activa. Más específicamente en el caso de infección con *M. tuberculosis* el valor de corte y el índice de estimulación pueden ser diferentes para infección por ejemplo TB extrapulmonar, TB pulmonar, o ambas, TB curada, TB latente. El corte, el índice de estimulación y el nivel de variación pueden ser diferentes cuando la infección se encuentra en presencia de VIH, otras infecciones conjuntas, supresión inmune.

50 Dependiendo de la prevalencia o prevalencia esperada de la presencia de enfermedad, el nivel de corte y/o el índice de estimulación se pueden ajustar para obtener resultados sólo falsos positivos o sólo falsos negativos según se desee, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y de las consecuencias de la determinación, si el paciente es positivo para el ensayo o negativo para el ensayo. En el caso de tuberculosis el ensayo presentado en esta invención tiene una ventaja clara frente a los otros ensayos in vitro actualmente disponibles. Debido a que la producción de IP-10 específica

de antígeno es mayor que el IFN- γ producido (véase por ejemplo el ejemplo 4 y 17), el corte y el índice de estimulación se pueden ajustar en intervalos más amplios, ampliando de este modo las posibilidades de diagnóstico.

El nivel de corte puede ser diferente, si hay que diagnosticar a un único paciente con síntomas o si el ensayo se va a usar en la búsqueda de indicios en un gran número de individuos de una población.

- 5 El corte y el índice de estimulación se pueden basar en mediciones de IP-10 combinadas y mediciones de otros biomarcadores tales como, pero sin limitarse a ellos, a interleucina-2, interferón gamma (INF- γ) y/o monocito/proteína 1 quimiotáctica de macrófagos 1 (MCP-1). Un corte y/o un índice de estimulación compuestos pueden dar como resultado otros valores, que se pueden determinar de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

- 10 Aunque cualquiera de los procedimientos analíticos conocidos para medir los niveles de estos analitos funcionarán en la presente invención, como resulta obvio para los expertos en la técnica el procedimiento analítico usado para cada marcador debe ser el mismo procedimiento usado para generar los datos de referencia para el marcador particular. Si se usa un nuevo procedimiento analítico para un marcador particular o una combinación de marcadores, se debe generar un nuevo conjunto de datos de referencia, basados en los datos desarrollados con el procedimiento.

- 15 El análisis DISCRIMINANT multivariado y otras determinaciones de riesgo se pueden realizar en el paquete estadístico de programa informático comercialmente disponible Statistical Analysis System (fabricado y vendido por SAS Institute Inc.) o mediante otros procedimientos de análisis estadístico multivariado u otros paquetes de software estadísticos conocidos para los expertos en la técnica.

- 20 Como es obvio para los expertos en la técnica, en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, cambiando el nivel de corte de riesgo de un ensayo positivo o usando diferentes riesgos a priori que se pueden aplicar a subgrupos en la población, podría cambiar los resultados del análisis discriminante para cada paciente.

- 25 Los ensayos de estabilidad descritos en el presente documento proponen que IP-10 es altamente estable con la manipulación de rutina (es decir, congelación o almacenamiento durante períodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente y temperaturas por debajo de 10 °C); de este modo, los presentes inventores concluyen que IP-10 es un analito atractivo para uso clínico. Los datos presentados aquí sugieren que IP-10 es un marcador potencialmente valioso para pronóstico, diagnóstico, seguimiento y búsqueda de enfermedades infecciosas.

Con el fin de determinar la severidad clínica de la reactividad inmune mediada por células, los medios para evaluar la señal detectable de IP-10 medida implican una referencia o medios de referencia.

- 30 La referencia también hace posible incluir variaciones de ensayo y de procedimiento, variaciones de kit, variaciones de manipulación, variaciones relacionadas con la combinación de IP-10 y otros biomarcadores, y otras variaciones no relacionadas directamente o indirectamente con el nivel de IP-10.

En el contexto de la presente invención, el término "referencia" se refiere a un estándar en relación con cantidad, calidad o tipo, frente a las que otros valores o características se pueden comparar, tal como por ejemplo una curva estándar.

- 35 Los datos de referencia reflejan el nivel de IP-10 para sujetos que tienen reactividad inmune mediada por células (también denominados afectados, expuestos, vacunados, infectados o enfermos) y/o el nivel de IP-10 para sujetos normales (también denominados no afectados, no expuestos, no vacunados, no infectados o sanos).

En otra realización más de la presente invención, el dispositivo se selecciona entre el grupo que consta de un ensayo, un inmunoensayo, una tira reactiva, una tira reactiva seca, un dispositivo eléctrico, un electrodo, un lector (lectores espectrofotométricos, lectores IR, lectores isotópicos y lectores similares), histoquímica, y medios similares que incorporan una referencia, papel de filtro, reacción de color visible a simple vista.

40 **IP-10**

La proteína 10 (IP-10) inducible por IFN- γ o CXCL10 es una quimioquina. El gen de IP-10 está mapeado al 4q21 mediante hibridación in situ. La expresión de IP-10 está aumentada mediante interferones (IFN es decir, interferón gamma (IFN- γ)) y estímulos inflamatorios, y se expresa en muchas enfermedades inflamatorias de tipo Th1 en una diversidad de tejidos y tipos de células.

- 45 La secuencia de genes humana se puede encontrar en ACCESSION número BC010954 (gi 15012099) en Gene Bank.

Las quimioquinas son un grupo de moléculas pequeñas (aproximadamente 8 a 14 kD), la mayoría estructuralmente relacionadas, que regulan el tráfico celular de diversos tipos de leucocitos mediante interacciones con un subconjunto de receptores acoplados a 7-transmembrana, proteína G. Las quimioquinas también desempeñan papeles fundamentales en el desarrollo, la homeostasis y el funcionamiento del sistema inmune, y tienen efectos sobre las

5 células del sistema nervioso central así como sobre células endoteliales implicadas en angiogénesis o angiostasis. Las quimioquinas se dividen en 2 subfamilias principales, CXC y CC, basándose en la disposición de los primeros 2 de los 4 restos de cisteína conservados; las 2 cisteínas están separadas por un único aminoácido en las quimioquinas CXC y son adyacentes en la quimioquinas CC. Las quimioquinas CXC además están subdivididas en los tipos ELR y no LR basados en la presencia o ausencia de una secuencia de glu-leu-arg adyacente y N terminal al motivo CXC. Los tipos ELR son quimiotácticos para neutrófilos, mientras que los tipos no ELR son quimiotácticos para linfocitos.

10 IP-10 inhibe la formación de colonias de médula ósea, tiene actividad antitumoral in vivo, es quimioattractiva para monocitos humanos y células T, y promueve la adhesión de células T a células endoteliales. IP-10 es un potente inhibidor de angiogénesis in vivo. IP-10 puede participar en la regulación de la angiogénesis durante la inflamación y tumorigénesis. IP-10 también es un gen diana de RAS y se sobreexpresa en la mayoría de cánceres colorrectales. Usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear se ha mostrado que IP-10 interactuaba con el extremo N de CXCR3 mediante una grieta hidrófoba formada por la región de bucle N y de bucle 40s de IP-10, similar a la superficie de interacción de otras quimioquinas, tal como IL8. Se encontró que una región adicional de interacción constaba de grieta hidrófoba formada por el extremo N y el bucle 30s de IP-10. La sugerencia de que un mecanismo que implica el bucle 30s y la configuración de la hebra beta 2 puede ser responsable de la interacción y en funcionamiento antagónico de IP-10 con CCR3.

15 En el caso de tuberculosis se han encontrado altos niveles de IP-10 en ganglios linfáticos y granulomas tuberculosos de pulmón en efusiones pleurales y en suero o plasma de pacientes de TB y TB-VIH coinfectados que experimentan síndrome de reconstitución inmune.

20 **Determinación del nivel de IP-10**

La molécula efectora inmune es preferiblemente una citoquina tal como, pero sin limitarse a ella, IP-10. La presencia o el nivel de efector inmune se puede determinar al nivel de la propia molécula o hasta el grado al que un gen se expresa. El nivel de IP-10 se mide mediante procedimientos analíticos convencionales, tales como los procedimientos inmunológicos conocidos en la técnica

25 Las mediciones del efector inmune se pueden combinar con mediciones de otros efectores inmunes en un gen, ARN, o nivel de proteína de acuerdo con las enseñanzas en el presente documento.

30 Como se ha establecido anteriormente, la detección de las moléculas de efector inmunes se puede realizar a niveles de proteína o ácido nucleico. Por lo tanto, la referencia a la presencia o al nivel de dicha molécula efectora inmune incluye datos directos e indirectos. Por ejemplo, altos niveles de IP-10 ARNm son datos indirectos que muestran los niveles incrementados de IP-10. Ligandos para los efectores inmunes son particularmente útiles en la detección y/o la cuantificación de estas moléculas.

35 Los anticuerpos a los efectores inmunes son particularmente útiles. Las técnicas para los ensayos contemplados en el presente documento se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos sándwich, multiplexión de xMAP, Luminex, ELISA y ELISpot. La referencia a anticuerpos incluye partes de anticuerpos, anticuerpos con características de mamífero (por ejemplo humanizados), anticuerpos recombinantes o sintéticos y anticuerpos de híbridos y de una sola cadena.

Los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales se pueden obtener mediante inmunización con los efectores inmunes o sus fragmentos antigénicos y cualquier tipo se puede usar para inmunoensayos. Los procedimientos de obtención de ambos tipos de suero se conocen bien en la técnica.

40 Se prefieren menos los sueros policlonales pero se preparan fácilmente mediante inyección de un animal de laboratorio adecuado con una cantidad eficaz de efector inmune, o su parte antigénica, recogida de suero o plasma del animal y aislar el suero específico mediante cualquiera de las técnicas inmuno adsorbentes conocidas. Aunque los anticuerpos producidos por este procedimiento se pueden usar en virtualmente cualquier tipo de inmunoensayo, por lo general son menos preferidos debido a la heterogeneidad potencial del producto.

45 El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo es particularmente preferido debido a la capacidad de producirlos en grandes cantidades y a la homogeneidad del producto. La preparación de líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpo monoclonal derivado mediante fusión de una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados contra la preparación inmunogénica se puede realizar mediante técnicas que conocen bien los expertos en la técnica.

50 La detección también se puede conseguir mediante cualquier medición directa de IP-10 usando anticuerpo en un inmunoensayo competitivo por polarización de fluorescencia (CFIPA) o mediante la detección de homodimerización de

interferón gamma mediante polarización de fluorescencia inducida por dimerización (DIFP). En cualquier caso, la detección y la cuantificación será inferior o menor que 6 pg/ml.

Con el procedimiento usado actualmente en el material de ejemplo suministrado el límite de detección del ensayo es 6 pg/ml, que con modificaciones puede ser menor.

- 5 Si el material de muestra está diluido, la concentración de IP-10 en dicha muestra será menor pero todavía determinable (véase ejemplo 9). Otros sistemas experimentales y otros parámetros darán como resultado otros valores, que se pueden determinar de acuerdo con las enseñanzas en el presente documento.

- 10 Son conocidas varias técnicas para los expertos en la técnica para la determinación de marcadores biológicos tal como IP-10. La presencia o el nivel de efector inmune se pueden determinar mediante ELISA, Luminex, ELISPOT, técnicas basadas en ARNm como RT-PCR o citometría de flujo intracelular.

Luminex

- 15 El interferón gamma (IFN- γ) ha sido el estándar de oro para la respuesta de Th1 en inmunología de enfermedades infecciosas y especialmente en inmunología de TB. El IFN- γ determinado por Luminex es un marcador pobre debido a la menor sensibilidad en comparación con ELISA comercial desarrollado para el ensayo Quantiferon (Véase el Ejemplo 10). Sin embargo IP-10 se detecta fácilmente mediante Luminex y puede por lo tanto sustituir a IFN- γ como herramienta de investigación o de detección (screening) en el sistema Luminex.

- 20 Los datos proporcionados en algunos de los ejemplos más adelante se generan mediante el uso de Luminex, que permite la multiplexión de analitos en solución con citometría de flujo. Usando una técnica registrada, microesferas xMAP de códigos de color interno de Luminex, se combinan diferentes proporciones de dos colorantes fluorescentes. Cada conjunto de perlas se conjuga con un anticuerpo de captura diferente. El uso de anticuerpos de detección marcados con R-ficoeritrina permite la cuantificación de reacciones antígeno-anticuerpo que se producen en la superficie del microesfera, mediante medición de la intensidad de fluorescencia relativa.

El sistema es capaz de medir muchas muestras en pequeños volúmenes, y hasta 100 diferentes analitos se pueden medir de manera simultánea en una sola muestra de 50 μ l.

- 25 Los datos actuales se obtuvieron de acuerdo con el protocolo de Biosource. En resumen, las suspensiones de perlas de IP-10 individual, y kits IFN- γ se combinaron en placas de 96 pocillos de filtro prehumectado. Las perlas se lavaron dos veces con solución de lavado y se añadió tampón de incubación.

- 30 Muestras (aquí 4 - 50 μ l) se diluyeron 1:32, 1:10, 1:8 ó 1:1 en dilución de ensayo y se añadieron a la placa. La placa se incubó 2 horas a temperatura ambiente a 600 rpm sobre un agitador de placa de valoración. Después de dos lavados, se añadieron 100 μ l de cóctel de anticuerpo de detección por pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora sobre un agitador de placas de valoración. Después de dos lavados, se añadieron 100 μ l de solución de estreptavidina-RPE por pocillo. Finalmente, después de 30 minutos de incubación y tres lavados, se añadieron 100 μ l de solución de lavado a cada pocillo y la placa se colocó en la plataforma XY del Luminex.

- 35 De cada pocillo, un mínimo de 100 perlas específicas de analito se analizaron para determinar tanto la fluorescencia de perlas como RPE.

ELISA

- 40 Los datos proporcionados en algunos de los ejemplos más adelante se generan mediante el uso de ELISA de acuerdo con el protocolo de Biosource. Se añadieron las muestras (5 μ l a 50 μ l) a los pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos precargada con anticuerpos IP-10. 50 μ l de Conjugado de biotina se añadió a los pocillos. La placa se tapó y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas antes que se aspirara el contenido de los pocillos y se lavó 4 veces con Tampón de Lavado de Trabajo. Después se añadieron 100 μ l de estreptavidina-HRP diluida a los pocillos y la placa se tapó y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después los pocillos se aspiraron y se lavaron 4 veces con Tampón de Lavado de Trabajo antes que se añadieran 50 μ l de Cromógeno Estabilizado a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, protegidos de la luz. Finalmente se añadieron 100 μ l de solución de parada a cada pocillo y la placa se leyó con un lector de ELISA a 450 nm. Ensayos Inmunocromatográficos (ICT).

Ensayos inmunocromatográfico (ICT)

Principio de ensayo: ICT (por ejemplo una tira reactiva lateral) es un ensayo inmunodiagnóstico in vitro que usa un anticuerpo primario (Ab) y de uno a cuatro Ab secundarios todos específicos para IP-10. El Ab primario unido a oro

coloidal e impregnado en una almohadilla de muestra con una banda que contiene un Ab secundario en una línea fijada.

En la primera etapa la muestra incubada se añade a la parte izquierda de la almohadilla de la muestra. Suero o plasma fluirá hacia la banda permitiendo a cualquier IP-10 presente unirse al Ab primario marcado con oro coloidal. El Ab secundario se inmoviliza en una línea a través de la membrana de la banda. Cuando se cierra la tarjeta, la muestra y el Ab primario marcado sobre la banda de la almohadilla se ponen en contacto con la membrana. La muestra y el Ab primario marcado después migran a lo largo de la banda de la membrana cruzando la línea de Ab secundario inmovilizado. Interpretación del ensayo: Cualquier IP-10 complejado con el Ab primario marcado con oro lo captura el Ab secundario en la membrana y se produce un cambio de color en la línea. Después el ensayo interpreta o bien a. basándose en la intensidad del color o b. mediante comparación de los dos ensayos, uno realizado sobre la muestra de respuesta (por ejemplo plasma de material de ensayo estimulada por antígeno como sangre entera) y uno realizado sobre la muestra nula, se resta la intensidad de cambio de color en el ensayo nulo de la intensidad de cambio de color en el ensayo de Ag y se compara esto con una referencia.

La lectura del ensayo también se puede automatizar o semiautomatizar usando una interfase de ordenador. Este sistema se puede construir de manera que la interface automática determine una intensidad de cambio de color de la línea.

Infección

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento, en el que la respuesta específica de antígeno de IP-10 por encima del nivel de referencia indica que el mamífero ha encontrado previamente el antígeno o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada al antígeno debido a por ejemplo una fase infecciosa tal como una enfermedad activa, infección subclínica activa, o infección reciente o latente o vacunado).

Microorganismo

De acuerdo con la presente descripción las infecciones pueden estar provocadas por un microorganismo, tales como, pero sin limitarse a él, bacterias, parásitos, hongos, virus, priones, y/o viroides

En una realización preferida actualmente el microorganismo se selecciona entre el grupo que consta de mycobacterias, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, Listeria, enterococos, Neisseria, vibrio, treponema (Sífilis), Borrelia, Leptospiræ, Chlamydia, retrovirus (SIV, VIH-1, VIH-2), Citomegalovirus, poxvirus, virus de Ebstein barr, enterovirus, morbilivirus, rabdovirus (rabia). Rubivirus (rubeola), flavivirus (dengue, fiebre amarilla), virus herpes, virus zoster de varicela, hepatitis C y B, Leishmania, Toxoplasma gondii, tripanosoma, Plasmodium (falciparum, vivax, ovale, malaria), pneumocystis carinii (PCP), Coronavirus (por ejemplo Síndrome Respiratorio Adquirido Severo (SARS)), Ebola o Marburg y diversos nematodos, trematodos.

En una realización todavía más preferida microorganismo se selecciona entre el grupo que consta de Mycobacteria, Leishmaniasis, Chlamydia, Tripanosomiasis y Esquistosomiasis.

En el caso en el que la infección es o estaba causada por mycobacterias es decir, como en la invención, dicha mycobacteria pertenece a los organismos del complejo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*), mycobacterias donde la región de diferencia (RD1) no se ha suprimido (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens*, *M. gastrii*), mycobacterias patógenas para los seres humanos (*M. avium* y *M. lepra*) y otras mycobacterias no tuberculosas.

De este modo, en una realización actualmente más preferida la mycobacteria es *M. tuberculosis*.

En el caso en el que la infección es o estaba provocada por Chlamydia, dicha Chlamydia se puede seleccionar entre el grupo que consta de *C. trachomatis*, *C. muridarum*, y *C. suis*, *C. pneumoniae* y o *C. psittaci*.

En una realización preferida de la presente descripción la Chlamydia es *C. trachomatis*.

Vacunación

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento, en el que la respuesta de IP-10 dependiente de antígeno por encima del nivel de referencia indica que el mamífero ha encontrado previamente el antígeno o previamente ha encontrado otros antígenos que generan reactividad cruzada al antígeno debido a una vacunación contra cualquier microorganismo que se menciona en el presente documento.

La respuesta a una vacuna basada en material no viable puede dar como resultado bajos niveles de IFN- γ específico de antígeno y debido a que IP-10 se libera en altas cantidades se puede usar para detectar respuestas a la vacuna en ensayos preclínicos, clínicos, y posteriormente en el establecimiento de rutinas.

Tuberculosis

5 Tuberculosis (abreviada de manera común como TB) es una enfermedad infecciosa provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, que de manera más común afecta a los pulmones (TB pulmonar) pero también puede afectar a otros órganos en el cuerpo por ejemplo el sistema nervioso central (meningitis), sistema linfático, sistema circulatorio (tuberculosis miliar), sistema genitourinario, huesos y articulaciones. Infección con *M. tuberculosis* también puede permanecer asintomática, una fase que se conoce comúnmente como infección de TB latente, durmiente o subclínica.

10 En una realización actualmente preferida, la presente descripción se refiere a un procedimiento de diagnóstico y de seguimientos varios, por ejemplo de distintas presentaciones de la tuberculosis: enfermedad de tuberculosis activa, infección de TB de microscopía activa o microscopía positiva o microscopía negativa, infección, de tuberculosis activa e infección de tuberculosis reciente.

15 El ensayo inmune se basa en la evaluación de la producción de IP-10 mediante linfocitos T específicos de antígeno en interacción con células que presentan antígeno (por ejemplo monocitos/macrófagos) que responden a secuencias de péptidos seleccionados de proteínas secretoras de MTB. Estas secuencias de péptido se han seleccionado por su inmunogenicidad y su especificidad, y potencialmente otros péptidos se pueden usar de manera similar.

20 El procedimiento y el kit se puede usar para diagnosticar la enfermedad de tuberculosis activa, para diagnosticar una infección reciente en contactos con individuos sanos de un paciente con una tuberculosis pulmonar positiva de esputo, para diagnosticar la salud con la infección latente, para controlar la respuesta al tratamiento en el caso de las tuberculosis pulmonar y extrapulmonar y para discriminar entre la infección latente y el estado patológico de tuberculosis activa.

Clamidia

25 Clamidia es un término común para infección con cualquier bacteria que pertenece al filo Chlamydiae. *Chlamydia trachomatis* es una causa infecciosa principal de enfermedad del ojo humano y genital. *C. trachomatis* se encuentra residente de manera natural solamente dentro de las células humanas y es una de las infecciones más comúnmente transmitidas por vía sexual en las personas en todo el mundo aproximadamente cuatro millones de casos de infección por Clamidia se producen en los Estados Unidos cada año. No todas las personas infectadas muestran los síntomas de la infección. Aproximadamente la mitad de todos los hombres y tres cuartas partes de todas las mujeres que tienen Clamidia no tienen síntomas y no saben que están infectados. Puede ser serio pero se cura fácilmente con antibióticos si se detecta a tiempo. Igualmente importante, la infección de Clamidia del ojo es la causa más común de ceguera evitable en el mundo.

30 En una realización actualmente preferida, la presente descripción se refiere a un procedimiento de diagnóstico y seguimiento de la infección por Clamidia.

35 El inmunoensayo se basa en la evaluación de la producción de IP-10 por parte de linfocitos T específicos de antígeno en interacción con células que presentan antígeno (por ejemplo monocitos/macrófagos) que responden a antígenos crudos o purificados tal como, pero sin limitarse a ellos, péptidos. Potencialmente las secuencias de péptido se pueden seleccionar para valorar su inmunogenicidad y su especificidad, y potencialmente otros péptidos de pueden usar de manera similar.

Antígeno

40 La elección del antígeno adecuado para la presente descripción también denominado antígeno (s) de ensayo y antígeno seleccionado para evaluación, depende del tipo de infección que los expertos en la técnica desearían evaluar de acuerdo con los antígenos seleccionados que están asociados a la enfermedad. Por ejemplo cuando se controla la infección de MTB cualesquiera antígenos MTB pueden generar la respuesta necesaria y viceversa. Varios antígenos se usan ya en los ensayos comerciales existentes. Se debe entender que cualquier característica y/o aspecto descrito anteriormente o más adelante junto con el (los) antígeno(s) de ensayo de acuerdo con la descripción se aplica por analogía al antígeno seleccionado para evaluación.

45 Cuando la infección se cree que está relacionada con tuberculosis, el antígeno o el al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de antígenos RD-1, ESAT-6, CFP10, TB7.7, Ag 85, HSP-65, Ag85A, Ag85B, MPT51, MPT64, TB10.4, Mtb8.4, hspX, Mtb12, Mtb9.9, Mtb32A, PstS-1, PstS-2, PstS-3, MPT63, Mtb39, Mtb41, MPT83, 71-kDa, PPE68 y LppX.

50 En una realización actualmente preferida el antígeno o el al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de antígenos ESAT-6, CFP-10 TB 7.7, Ag 85,HSP 65 y RD-1.

En otra realización más de la presente invención el antígeno es ESAT-6.

En otra realización de la presente invención el antígeno es CFP-10.

En una realización adicional de la presente invención el antígeno es TB 7.7.

En una realización actualmente preferida de la presente invención los antígenos son antígenos RD-1.

5 Varias instituciones de investigación están trabajando en la identificación de antígenos, expresados de manera formal por el agente infeccioso individual, los denominados antígenos específicos de microbios o específicos de enfermedad. En el caso de *M. tuberculosis*, los antígenos específicos se expresan en fases diferentes de infección tales como, pero sin limitarse a ellas, fases durmiente, latente, activa, reciente, pulmonar, extrapulmonar, localizada o curada.

10 La presente invención se puede implementar usando tales antígenos de manera que se proporcione una herramienta para la identificación de esa fase específica (por ejemplo infección latente con *M. tuberculosis*).

15 En una realización preferida, varios antígenos de los mismos microorganismos se pueden añadir cuando se genera la muestra de respuesta. Mediante la adición de varios antígenos con diversas preferencias de tipo de tejido se incrementa la fortaleza del ensayo. En el caso de la tuberculosis, combinando antígeno-péptidos de proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB7.7 se incrementa la probabilidad de que el ensayo cubra el intervalo más amplio de tipos de tejido y de este modo proporcione resultados de ensayo más fuertes y más fiables en diferentes poblaciones de pacientes.

Donde se cree que la infección está relacionada con *Clamydia*, el antígeno o el al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de extracto de Serovar D, proteína de la membrana exterior principal (MOMP), proteínas de la membrana exterior ricas en cisteína (OMP), OMP2, OMP3, OMP polimórficas (POMP), adenosina difosfato / adenosina trifosfato translocasa de *Clamydia pneumonia*, proteínas B de porina (PorBs), y CT521.

20 Como es evidente a partir de la presente descripción la fuente de infección puede variar. En una realización de la presente descripción el antígeno o el al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de epimastigotos fijados, tripomastigotos fijados, epimastigotos rotos, tripomastigotos rotos, fracciones antigénicas purificadas de epimastigotos, fracciones antigénicas semipurificadas de epimastigotos, antígenos excretadores-secretadores de tripomastigotos (TESA), tipo de antígeno variable predominante (VAT), glicoproteína de superficie variable (VSG), trans-sialidasa (TS) por ejemplo TS13, proteína-2 de superficie de amastigoto (ASP2), KMP-11m, CRA, Ag30, JL8, TCR27, Ag1, JL7, H49, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, MAP, SAPA, TCNA, Ag13, TcD, B12, TcE, JL5, A13, 1F8, Tc-24, Tc-28, Tc-40, Cy-hsp70, MR-HSP70, Grp-hsp78, CEA, CRP, SA85-1.1, FCaBP (proteína de unión Ca^{2+} flagelar), FL-160 (proteína de la superficie flagelar de 160 kDa) y FRA (antígeno repetitivo flagelar) estando dichos antígenos relacionados con Tripanosomas.

30 En una realización preferida de la presente descripción el antígeno o el al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de epimastigotos fijados, tripomastigotos fijados, epimastigotos rotos, tripomastigotos rotos, fracciones antigénicas purificadas de epimastigotos, fracciones antigénicas semipurificadas de epimastigotos, antígenos excretadores - secretadores de tripomastigotos (TESA), tipo de antígeno variable predominante (VAT), glicoproteína de la superficie variable (VSG), trans-sialidasa (TS) por ejemplo TS13, proteína-2 de la superficie de amastigoto (ASP2), FCaBP (proteína de unión Ca^{2+} flagelar), FL-160 (proteína de la superficie Ca^{2+} flagelar de 160 kDa) y FRA (antígeno repetitivo flagelar).

40 En el caso en el que la infección se relaciona con esquistosoma, el antígeno o al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de huevo de esquistosoma roto, glicoproteínas excretadas/secretadas (ES), glicoproteínas tegumentales (TG), antígeno de huevo soluble (SEA), extracto soluble de *S. mansoni* (SWAP), hemocianina de lapa californiana (KLH), RP26, Sj 31, Sj 32, paramiosina, Sm62-IrV5, Sm37-SG3PDH, Sm28-GST, Sm14-FABP, PR52-filamina PL45-fosfoglicerato quinasa, PN18-ciclofilina, MAP3, Sm23, MAP4, Sm28-TPI, Sm97, CAA, CCA y, proteína 70 de choque térmico de *Schistosoma mansoni*.

45 En una realización preferida de la presente descripción el antígeno o el al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de glicoproteínas excretadas/secretadas (ES), glicoproteínas tegumentales (TG), antígeno de huevo soluble (SEA), extracto soluble de *S. mansoni* (SWAP), hemocianina de lapa californiana (KLH) y, RP26.

Con respecto a leishmania, el antígeno o al menos un antígeno se selecciona entre el grupo que consta de promastigozyes rotos, leishmanina, rGBP, rORFF, rgp63, rK9, rK26, rK39, PN18-ciclofilina, MAP3, Sm23, MAP4, Sm28-TPI, Sm97, CAA y, CCA.

De hecho cualquier antígeno específico para la especie a analizar puede ser útil de acuerdo con la presente descripción.

En otra realización preferida, un intervalo de diferentes antígenos de diferentes enfermedades se puede combinar para permitir una herramienta de búsqueda con baja especificidad para la enfermedad individual pero con alta sensibilidad para "infección". Un kit que combina por ejemplo una paleta de antígenos de microbios de soldados que han quedado expuestos durante una misión (por ejemplo malaria, tuberculosis, leishmania, esquistosoma y/o tripanosomiasis) permitirá a los doctores realizar un ensayo de búsqueda rápida en lugar de varios ensayos diferentes.

En otra realización preferida, los kits combinados pueden comprender antígenos de diversos microbios que infectan un órgano (por ejemplo especies de *Nesseria* y *Clamydia* que provocan enfermedad inflamatoria pélvica), o comprender antígenos de agentes infecciosos que provocan síntomas comunes (por ejemplo la diarrea tratable provocada por infección por *Campylobacter* y *Shigella* se podría distinguir de la diarrea no tratable provocada por virus, por ejemplo rotavirus).

Sujeto

La referencia a un "sujeto" incluye una especie humana o no humana que incluye primates, animales de ganadería (por ejemplo ovejas, vacas, cerdos, caballos, burros, cabras), los animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo ratones, ratas, conejos, cobayas, hámsteres), animales de compañía (por ejemplo perros, gatos), especies de aves (por ejemplo aves de corral, pájaros), reptiles y anfibios. Por lo tanto, la presente descripción tiene aplicabilidad en medicina humana así como en aplicaciones para el ganado, veterinarias y para la fauna salvaje. La presente invención usa muestras de seres humanos.

Por lo tanto, las realizaciones anteriores se consideran a todos los respectos ilustrativos en lugar de limitantes de la invención descrita en el presente documento. Se indica así que el alcance de la invención son las reivindicaciones anexas más que la descripción anterior.

A lo largo de toda esta memoria descriptiva la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento establecido, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero sin la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

La invención se describirá de aquí en adelante por medio de las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes

Leyendas de las figuras

Figura 1

La correlación entre IFN- γ en plasma, IP-10, y IFN- γ . Se estimuló sangre entera durante 20 - 24 horas con solución salina (no estimulada) (1a), antígenos específicos de *M. tuberculosis* (1b) o mitógeno (1c). La producción de citoquina se midió en los sobrenadantes en plasma mediante ELISA (IFN- γ) o multiplex (IP-10).

Figura 2

Comparación de producción de IFN- γ específico de antígeno y de citoquina de IP-10 (es decir, Ag-Nula) medida mediante Quantiferon ELISA y Luminex respectivamente. Los valores están en pg/ml. Las líneas rectas representan valores medios, para el intermedio véase la tabla 2.

Figura 3

La curva de ROC presenta la sensibilidad y la especificidad del ensayo de IP-10. El eje x presenta la especificidad, el eje y la sensibilidad.

Figuras 4

Una comparación de la producción de IP-10 y IFN- γ específica de antígeno. IFN- γ se examina, IP-10 no diluido se analiza en dilución 1:8.

Figura 5

Producción de IFN- γ y IP-10/CXCL10 específica de antígeno en pacientes con un ensayo de Quantiferon negativo o indeterminado. Sangre entera de 6 Quantiferónn en el tubo (QFT-IT) negativo y un paciente de TB indeterminado de QFT-IT indeterminado TB paciente se estimularon durante 20 - 24 horas con solución salina o antígenos específicos de *M. tuberculosis*. La producción de citoquina se midió en el sobrenadante en plasma mediante ELISA (IFN- γ) y tecnología multiplex (IP-10). La producción específica de antígeno representa la muestra estimulada por antígeno menos la muestra no estimulada. Las líneas rectas representan valores de la mediana, (test de rango con signos de Wilcoxon).

Ejemplos

En los siguientes ejemplos la realización del ensayo de IP-10 se demuestra usando infección con *Mycobacterium tuberculosis* y *Clamydia Trachomatis* como ejemplos del principio de ensayo.

Procedimientos generales

- 5 En los ejemplos 1-17 los inventores usaron estimulación de sangre entera para demostrar el principio. En el ejemplo ejemplo 18 los inventores usaron células mononucleares de sangre purificada (PBMC).

Estimulación de sangre entera

1. El volumen de 1 ml de sangre heparinizada se extrajo en tres tubos vacutainer (Cellestis, Australia) recubiertos con
 - a. solución salina, para generar la muestra no estimulada o muestra nula (usada indistintamente)
 - 10 b. péptidos procedentes de las proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB-7.7 para generar la muestra del antígeno (Ag)
 - c. fitohemaglutinina (PHA) para generar la muestra de mitógeno.
2. Los tubos se incubaron 20 - 24h a 37 °C.
3. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 2000 rpm
4. Se recogió plasma y se congeló a por debajo de -40 °C

- 15 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

1. Las PBMC se separaron de la sangre entera mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphoprep; Nycomed) y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso
2. Las PBMC se descongelaron y se volvieron a suspender en RPMI 1640, suplementado con un 1 % de penicilina/estreptomicina, un 1 % de aminoácidos no esenciales, un 1 % de glutamina, un 1 % de pirovato, un 1 % de HEPES y un 10 % de suero humano AB (banco de sangre local, Rigshospitalet, Copenhagen)
- 20 3. La viabilidad y el número de células se determinaron mediante tinción con nigrosina
4. Las células se cultivaron por trillaje en placas de microvaloración de fondo redondo (Nunc) a $1,25 \times 10^5$ células/pocillo en un volumen total de 100 μ l

Preparación de antígeno de extracto de la cepa de C. Trachomatis serovar D

- 25 1. La cepa de C. Trachomatis serovar D (UW-3/Cx) se propagó en células HeLa 229 y se fraccionaron en 30 fracciones de peso molecular reducido usando una técnica de elución múltiple.
2. C. Trachomatis serovar D en tampón SPG se centrifugó a 30.000 g durante 30 min
3. Se volvió a suspender el sedimento 1:1 en agua estéril y tampón de muestra de reducción laemmli, seguido de ebullición durante 5 minutos.
- 30 4. Después de sonicación repetida, la suspensión se centrifugó a 30.000 g durante 30 min.
5. El extracto bruto de sobrenadante del extracto de la cepa C. Trachomatis serovar D se usó como antígeno.

Estimulación de PBMC con antígeno de Serovar D

1. Las PBMC se sembraron como se ha descrito anteriormente y se estimularon las células con
 - a. 2 μ g/ml, antígeno de serovar D para generar la muestra de antígeno
 - 35 b. Sin antígeno para generar la muestra no estimulada
2. Las células se incubaron a 37 °C en aire humidificado (5 % de CO₂ y 95 % de aire)
3. Los sobrenadantes se recogieron 5 días para cuantificación de IP-10

4. El plasma se recogió a o por debajo de -40 °C

Mediciones de biomarcador

Luminex:

IP-10 y/o MCP-1 y/o IL-2 se midieron sobre la plataforma luminex y se realizó de acuerdo con el protocolo Biosource.

- 5 1. Las suspensiones de perlas de kits IP-10, IL-2, MCP-2 y/o IFN- γ individuales se combinaron en placas de 96 pocillos de filtro humedecido previamente.
2. Las perlas se lavaron dos veces con solución de lavado y se añadió tampón de incubación.
3. Se diluyeron las muestras 1:1, 1:8 1:10, o 1:20 en dilución de ensayo y se añadieron 100 μ l a la placa.
4. La placa se incubó 2 horas a temperatura ambiente a 600 rpm sobre un agitador de placa de valoración.
- 10 5. Después de dos lavados, se añadieron 100 μ l de cóctel de anticuerpo de detección por pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora sobre un agitador de placa de valoración.
6. Después de dos lavados, se añadieron 100 μ l de solución de estreptavidina-RPE por pocillo.
7. Después de 30 minutos de incubación y tres lavados, se añadieron 100 μ l de solución de lavado a cada pocillo y se colocó la placa en la plataforma XY del Luminex.
- 15 8. De cada pocillo, se analizó un mínimo de 100 perlas específicas de analito para determinar la fluorescencia tanto de las perlas como de RPE.

ELISA de IP-10

Las mediciones de IP-10 se realizaron usando un ELISA de tipo de una sola etapa de Biosource (Invitrogen, Estados Unidos).

20 ELISA de IFN- γ

Las mediciones de IFN- γ se realizaron usando un ELISA de tipo sándwich de una sola etapa; el ELISA de Quantiferon IFN- γ (Cellestis, Australia). Los niveles de IFN- γ se analizaron usando el software proporcionado por el fabricante (versión 2.50). el kit de ELISA Cellestis trabaja en unidades internacionales (UI) (1 Unidad/ml corresponde a una concentración de 50 pg/ml) en los presentes ejemplos los inventores presentan los resultados de ELISA de IFN- γ en pg/ml.

25

Ensayo de Quantiferon (ensayo QFT-IT)

- La producción de IFN- γ se mide usando el ELISA de Quantiferon. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, la respuesta de IFN- γ de la muestra no estimulada se resta de la respuesta de IFN- γ en la muestra estimulada con antígenos específicos de M. tuberculosis y en la muestra de mitógeno. El resultado de QFT-IT se consideró "positivo" si la respuesta a los antígenos específicos era $\geq 17,5$ pg/ml (0,35 UI/ml) y ≥ 25 % del valor no estimulado, independientemente de la respuesta IFN- γ estimulada por mitógeno; "negativo" si la respuesta a antígenos específicos era $< 17,5$ pg/ml (0,35 UI/ml) y la respuesta IFN- γ estimulada por mitógeno era ≥ 25 pg/ml (0,5UI/ml). Un ensayo se consideró "indeterminado" si tanto la respuesta a antígenos específicos era $< 17,5$ pg/ml (0,35 UI/ml) como la respuesta IFN- γ estimulada por mitógeno era ≤ 25 pg/ml (0,5UI/ml); o la respuesta de IFN- γ en la muestra no estimulada era ≥ 400 pg/ml (8 UI/ml) independiente de la respuesta específica de antígeno o estimulada por mitógeno.

30

35

Ejemplo 1

Se inducen niveles de IP-10 en plasma altos por estimulación de sangre entera con antígenos específicos de M. tuberculosis de pacientes infectados con M. tuberculosis

- 40 Los investigadores examinaron sangre entera de 12 pacientes con tuberculosis pulmonar de esputo positivo de Dinamarca (n = 2) y Guinea Bissau (n = 9), y 11 controles daneses no expuestos a TB sanos (doctores jóvenes, investigadores y estudiantes del Departamento de enfermedades infecciosas y unidad de investigación clínica en el Hospital Hvidovre). Ningún paciente era VIH positivo. El estudio fue aprobado por el comité ético de Copenhage, la municipalidad de Frederiksberg y el Comité ético de Guinea Bissau.

Resultados

Los niveles de IFN- γ e IP-10 (valores medianos e intervalo) en el plasma de muestras de sangre entera incubadas con Nil, Ag o mitógeno, medidos mediante Luminex IP-10, Luminex IFN- γ o el Quantiferon - ELISA de IFN- γ comercial se presentan en la tabla 1.

- 5 La producción de IP-10 después de incubación con antígenos específicos de *M. tuberculosis* está fuertemente asociada a la presencia de una infección con *M. tuberculosis* en el paciente; Los niveles muy altos de IP-10 en el plasma, 1025 pg/ml (intervalo: 497,3-2080,4 pg/ml), de cultivo de sangre entera se indujeron durante la estimulación con antígenos específicos de *M. tuberculosis* en los pacientes infectados con *M. tuberculosis* mientras que, niveles muy bajos de IP-10 40,4 pg/ml (intervalo: 19,7 – 158,8) se observaron en cultivo de sangre entera de los 11 individuos sanos daneses sin
- 10 exposición conocida o signos de infección con *M. tuberculosis* (controles). La diferencia entre los dos grupos era altamente significativo; $p < 0,0001$ mostrando que la liberación de IP-10 está de hecho inducida por antígeno.

La cantidad de IP-10 estimulada por antígeno de 1024 pg/ml (intervalo 497 - 2080 pg/ml) era significativamente mayor que los niveles de IFN- γ determinados por ELISA de 223,5 (99 - 1283 pg/ml) y Luminex 90,7 pg/ml (37 - 464 pg/ml) ($p = 0,01$ y $0,001$)

- 15 Comparados con IP-10, Qunatiferon-ELISA se determinaron niveles de IFN- γ ϵ en plasma significativamente menores, pero la diferencia entre infectados con TB y no infectados con TB seguía siendo significativa. IFN- γ medido por Luminex eran incluso menores que IFN- γ medido mediante QFT-IFN- γ ELISA y por lo tanto no se discutirán más.

- 20 En conclusión, IP-10 es un marcador altamente específico para la infección con *M. tuberculosis* cuando la sangre entera de una persona infectada se estimula con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. IP-10 es mucho más fácil de medir y tiene un gran potencial como marcador más sensible debido a los altos niveles liberados.

Tabla 1

| | Producción de IFN- γ e IP-10 (pg/ml) ^a en plasma de solución salina, antígeno, o sangre entera estimulada por mitógeno: | |
|--|---|------------------------------------|
| | Controles (n = 11) | Pacientes TB (n = 12) |
| IFN-γ (ELISA) | | |
| Solución salina | 8,5 (6,5 - 11,5) | 10,3 (6,5 - 134,5) |
| Antígenos | 8,9 (5,0 - 14,0) | 223,5 (99,0 - 1283,0) ^b |
| Mitógeno | 1613,0 (45,5 - 1798,5) | 272,8 (31,5 - 1750,5) |
| IFN-γ (Multiplex) | | |
| Solución salina | 5,0 (5,0 - 11,5) | 5,0 (5,0 - 70,2) |
| Antígenos | 5,0 (5,0 - 11,8) | 90,7 (37,3 - 464,2) ^b |
| Mitógeno | 291,9 (5,0 - 2980,7) | 160,9 (5,0 - 2913,4) |
| IP-10 | | |
| Solución salina | 27,1 (17,7 - 140,6) | 150,9 (61,1 - 991,9) ^c |
| Antígenos | 40,4 (19,7 - 158,8) | 1025 (497,3 - 2080,4) ^b |
| Mitógeno | 993,5 (164,0 - >2800) | 843,0 (384,4 - 2587,9) |

- 25 Tabla 1: Producción de IFN- γ e IP-10 en cultivo de sangre entera. Sangre entera se estimuló 20 - 24 horas con solución salina (no estimulada), antígenos específicos de *M. tuberculosis* o mitógeno. La producción de citoquina se midió por ELISA (IFN- γ) y multiplex (IFN- γ , IP-10). ^a Valores son medianos (intervalo). ^b Significativamente diferente ($P < 0,0001$).^c Significativamente diferente ($P < 0,0005$).^d Significativamente diferente ($P < 0,008$). Ensayo Kruskal-Wallis

Ejemplo 2

Liberación de IP-10 espontánea aumentada en plasma de cultivo de sangre entera no estimulada (muestra nula) de pacientes con infección activa de TB; IP-10 como marcador para enfermedad activa.

5 Como se observa en la tabla 1, los pacientes con tuberculosis activa tenían niveles en plasma 5,6 veces más altos de IP-10 en muestras de sangre entera no estimuladas (nula) (150,9 pg/ml (61,1 - 991,9)) comparado con los controles sanos (27,1 pg/ml (17,7 - 140,6)) $p = 0,0005$. No había diferencia significativa en IP-10 nulo en plasma entre pacientes con tuberculosis activa de Guinea Bissau y Dinamarca ($p = 0,67$).

En conclusión: esto indica que la determinación de liberación de IP-10 espontánea en combinación con la liberación de IP-10 estimulada por antígeno se puede usar para discriminar individuos sanos de pacientes con TB activa.

10 **Ejemplo 3**

Correlación entre liberación de IFN- γ y IP-10

15 Existe una fuerte correlación entre IFN- γ y liberación de IP-10 en cultivo de sangre entera, pero la liberación de IP-10 es de magnitud mayor. Las respuestas individuales a IP-10 después de estimulación nula, por antígeno o mitógeno y el correspondiente ELISA de IFN- γ se muestran en la figura 1a - c. Había una fuerte correlación entre los niveles de IP-10 y ELISA de IFN- γ en el plasma de sangre entera estimulada por antígeno (r de Spearman = 0,87, 95 % C.I. 0.71 to 0.95, $p < 0.0001$) (fig 1b) y en el plasma de sangre entera estimulada por mitógeno, aunque no al mismo nivel ($r = 0,54$, 95 % C.I. 0,15 a 0,78, $p = 0,008$ (fig 1c).

En conclusión: la liberación de IP-10 y IFN- γ en cultivo de sangre entera se correlaciona, pero la liberación de IP-10 es de mayor magnitud. Esto hace de IP-10 un mejor marcador que IFN- γ en ensayos de TB in-vitro.

20 **Ejemplo 4**

La producción de IP-10 específica de antígeno es mayor que la producción de IFN- γ específica de antígeno.

25 Para determinar la cantidad de citoquina liberada en respuesta a los antígenos presentes en el cultivo (es decir, la respuesta de citoquina específica de antígeno (específica de Ag)). La respuesta de citoquina específica de antígeno se calculó como un valor delta (= producción de citoquina en cultivo de sangre entera estimulada por antígeno restada de la cantidad liberada en el plasma de cultivo de sangre entera no estimulada). El valor delta permite a los investigadores comparar la producción de citoquina de IFN- γ y IP-10 específica de antígeno. Como se observa en la figura 2, el ensayo de IP-10 mide valores mayores de IP-10 específicos de Ag (870,4 pg/ml (260,5 - 1575.9 pg/ml)) comparado con Ag-specific IFN- γ específico de Ag (216,5 pg/ml (80,5 - 1273,0 pg/ml)) $p = 0,006$ (Mann-Whitney). Los valores medianos e intervalos se presentan en la tabla 2.

30 En conclusión: IP-10 se libera en mayores cantidades ($p = 0,006$) y por lo tanto es más fácil de medir y parece un mejor marcador que IFN- γ .

Tabla 2

| | Controles (n = 11) | TB (n = 12) | Valores de p |
|---|--------------------|------------------------|--------------|
| INF-γ, Quantiferon | | | |
| Elisa (pg/ml) | | | |
| Ag, Nula, mediana (intervalo) | - 0,5 (-3,5 - 3,5) | 216,5 (80,5-1273,0) | < 0,001 |
| IP-10, Luminex | | | |
| (pg/ml) | | | |
| Nula, mediana (intervalo) | 10,8 (1,1 - 27,6) | 870,4 (260,5 - 1575,9) | < 0,001 Ag, |

35 Tabla 2. Comparación de INF- γ específico de Ag y producción de citoquina de IP-10 medida mediante Quantiferon ELISA y Luminex respectivamente (ensayo Kruskal-Wallis).

Ejemplo 5

Sensibilidad y especificidad muy alta del ensayo de IP-10

La sensibilidad y especificidad muy alta del ensayo IP-10 se demuestra usando TB como un ejemplo del principio de ensayo. La alta sensibilidad y especificidad del ensayo IP-10 descrito en la invención se determina usando un análisis de curva de ROC basado en los valores de los niveles de IP-10 específico de antígeno (nulo restado de estimulado por antígeno). El presente análisis de curva de ROC se basa en los 12 pacientes de TB y 11 controles sanos descritos en el ejemplo 1, En la figura 3 los inventores demuestran que el ensayo de IP-10 diferencia perfectamente entre pacientes con tuberculosis activa y controles sanos. En este experimento el ensayo de IP-10 tiene un Área Bajo la Curva (AUC) de 1,0.

Conclusión: el ensayo de IP-10 usado en la diagnosis de infección con *M. tuberculosis* se mostró que era un 100 % sensible y un 100 % específico, que es un mejor comportamiento que el usado actualmente en ensayos in vitro TB. El ensayo de IP-10 es aquí claramente capaz de discriminar entre pacientes con y sin infección por tuberculosis. Basados en este material limitado es posible establecer el corte entre 27,6 pg/ml y 260,5 pg/ml y lograr la segregación completa.

Ejemplo 6

IP-10 es un marcador eficaz para TB latente en sujetos inmunosuprimidos

Sangre entera de seis pacientes con artritis reumatoide (RA) que reciben corticoesteroides y methotrexate© se estimularon con nula, un antígeno específico de *M. tuberculosis* (ESAT6), o mitógeno (PHA). La concentración de IP-10 se midió en el sobrenadante usando Luminex como se ha descrito anteriormente. Los pacientes 1 - 3 se sabía que eran de ensayo negativo de Quantiferon y los pacientes 4-6 eran de ensayo positivo de Quantiferon.

Como se observa en la tabla 3, todos los pacientes, a pesar de la supresión inmune, generaban altos niveles de IP-10 en respuesta al control de mitógeno positivo. Altos niveles de IP-10 estimulado por ESAT6 (intervalo 668 - 2800 pg/ml) se observaron en todos los pacientes con TB latente (ensayo de Quantiferon positivo). En conclusión, el ensayo basado en IP-10 se puede usar para la diagnosis de infección latente de TB en pacientes con supresión inmune.

Tabla 3

| Paciente | Ensayo QFT | Nula | ESAT6 | Mitógeno |
|----------|------------|------|-------|----------|
| 1 | - | 35 | 184 | 1141 |
| 2 | - | 87 | 95 | 2800 |
| 3 | - | 38 | 47 | 2800 |
| 4 | + | 34 | 2800 | 1589 |
| 5 | + | 63 | 1605 | 2800 |
| 6 | + | 31 | 668 | 1393 |

Tabla 3. Seis pacientes con artritis reumatoide se estimularon con nula, ESAT-6 (uno de los antígenos usados en el ensayo de Quantiferon), o mitógeno, IP-10 se midió mediante Luminex. Los tres pacientes superiores son de ensayo de Quantiferon negativo y los tres inferiores son de ensayo positivo de Quantiferon. Todos los pacientes están libres de síntomas de enfermedad de TB activa pero lo padecen y están bajo medicación inmunosupresora masiva para RA severo (candidatos para tratamiento biológico es decir, bloqueadores de TNF-α).

Ejemplo 7

IP-10 como marcador para TB latente en personas sanas con exposición conocida a TB en la juventud

Dos personas de prueba (RV y AKA) con exposición a TB conocida en la juventud, conversión de PPD demostrada y sin quimiopprofilaxis de tuberculosis ni comorbidad se sometieron a ensayos para detectar la sensibilidad de IP-10 usando el procedimiento descrito anteriormente. Los donantes se sabe que son Quantiferon positivo a partir de los ensayos anteriores. Los dos probandos reaccionaron con respuestas intensas de IP-10 específica a antígeno (ESAT-6)

(302.9pg/ml y 916.1pg/ml), véase en la tabla 9. El probando RV fue sometidos a pruebas en 2 meses distintos y hubo una buena reprodución de los resultados (datos no mostrados).

[0282] En conclusión: IP-10 es un marcador vigoroso para la infección con tuberculosis latente.

Tabla 4

| Paciente | Ensayo QFT | Nula + Ag | (Estimulación de ESAT6 solamente | Mitógeno |
|----------|------------|-----------|----------------------------------|----------|
| AKA | + | 22,5 | 325,4 | 631 |
| RV | + | 10,4 | 926,5 | 491,5 |

5

Tabla 4. Dos pacientes sanos con exposición a TB conocida en la juventud se someten a pruebas para detectar la capacidad de respuesta a antígenos de tuberculosis (ESAT6).

Ejemplo 8

El nivel de IP-10 espontáneo en una muestra en combinación con la liberación de IP-10 específica de antígeno, puede distinguir sanos con o sin infección latente de TB de pacientes con TB activa.

En el ejemplo 6 (tabla 3) los inventores mostraron que los niveles de IP-10 espontáneos (nulos) son bajos en pacientes con artritis reumatoide tanto infectados con tuberculosis latente (34 pg/ml (intervalo 31 - 63 pg/ml)) como no infectados (38 pg/ml (intervalo 35 - 87pg/ml)). Estos niveles están a un nivel bajo similar al observado en donantes sanos no infectados (27,1 pg/ml (intervalo 17,7 - 140,6 pg/ml), tabla 1) y donantes infectados de manera latente (22,5 y 10,4 pg/ml), tabla 4.). Si los inventores combinan todos los pacientes sin tuberculosis activa y se comparan estos bajos niveles con los altos niveles de liberación de IP-10 espontánea observada en pacientes con TB activa (150,9 pg/ml (intervalo 61,1 - 991.9)) (tabla 1) los inventores encuentran una diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$, Mann Whitney). En conclusión, la combinación de liberación de IP-10 espontánea y específica de antígeno se puede usar para discriminar entre infección por tuberculosis activa y latente.

Ejemplo 9

La dilución de muestras de plasma se pueden realizar sin la pérdida de la sensibilidad del ensayo de IP-10

La dilución de una muestra es una reducción por etapas de las concentraciones mediante la adición de una solución diluida. Los inventores han ensayado si la dilución de una muestra de plasma después de la incubación interfiere con la relación entre muestras de plasma con alta y baja concentración de IP-10, y si esta dilución interfiere con la sensibilidad del ensayo de IP-10. Las muestras se diluyeron en la dilución de ensayo proporcionado por el kit Biosource Lumindex.

Como se observa a partir de la tabla 5, la dilución de las muestras da como resultado una reducción por etapas de los niveles de IP-10 en plasma de sangre entera estimulado por antígeno y por mitógeno y plasma y sangre entera no estimulado (nula).

| IP-10 | | | |
|-----------------|--------------------|------------|------------|
| | Factor de dilución | Paciente A | Paciente B |
| Nulo | 1:2 | 22,5 | 10,4 |
| | 1:4 | 11,7 | 5,2 |
| | 1:8 | 4,4 | 2,9 |
| | 1:16 | 1,3 | 1,3 |
| Antígeno | 1:2 | 631 | 491 |
| | 1:4 | 430 | 327 |
| | 1:8 | 396 | 197 |

| | | | |
|-----------------|-------------|------------|------------|
| | 1:16 | 277 | 130 |
| Mitógeno | 1:2 | 325 | 927 |
| | 1:4 | 225 | 541 |
| | 1:8 | 139 | 438 |
| | 1:16 | 89 | 326 |

Tabla 5. Plasma de sangre entera nula y estimulada por antígeno y mitógeno se diluyó 1:2 - 1:6 en dilución de ensayo y se analizó para determinar los niveles de IP-10 usando Luminex.

5 **En la tabla 5 los investigadores han visto que la concentración de IP-10 específica de antígeno permanece muy alta incluso en las muestras diluidas 16 veces (275 pg/ml y 128 pg/ml)**

En la tabla 5 los inventores observan que la concentración de IP-10 específica de antígeno permanece muy alta incluso en la muestras diluidas 16 veces (275 pg/ml y 128 pg/ml).

10 La Figura 4 presenta los datos de 7 controles y 8 pacientes de tuberculosis sometidos a pruebas para detectar las respuestas de IFN- γ y de IP-10 específicas de antígeno. La producción de IP-10 se mide después de la dilución 1:8 veces de la muestra y la respuesta de IFN- γ se mide en la muestra no diluida. De nuevo los inventores encuentran altos valores de IP-10 específicos que indican que IP-10 es un marcador para la infección por M. tuberculosis ($p = 0.0003$) incluso a 1:8 veces de dilución. Además los valores IP-10 de dilución 1:8 (mediana 1097pg/ml (intervalo 225 - 3045 pg/ml)) son mayores comparados con el IFN- γ analizado en el material de muestra no diluida (mediana 269 pg/ml (intervalo 81 – 1273 pg/ml)) $p = 0,014$ (prueba de pares igualados de Wilcoxon).

15 Estos resultados demuestran que IP-10 es un marcador muy robusto para un ensayo de diagnóstico y que el ensayo de IP-10 se puede usar en un sistema de ensayo donde el material de muestra es muy escaso. Esto abre una gama completa de aplicaciones de aplicaciones del ensayo de IP-10, donde la muestra se puede diluir (o bien antes o después de la incubación) en los casos en los que solamente muy poco material de muestra está disponible (directamente aplicable in por ejemplo en un producto comercial para niños con muy poco volumen de sangre)

20 En conclusión: se demuestra que las muestras de plasma se pueden diluir sin perder la sensibilidad del ensayo de IP-10

Ejemplo 10

IP-10 es más sensible que IFN- γ y mejora la diagnosis in vitro de la infección por tuberculosis

25 Para explorar si IP-10 tenía el potencial para mejorar la sensibilidad del ensayo QFT-IT actual, los inventores ensayaron la respuesta de IP-10s en pacientes de tuberculosis con resultados de ensayo negativos o indeterminados de QFT-IT, (para las características de los pacientes y las mediciones individuales véase la tabla 6). Estos pacientes eran en otras palabras falsos negativos en el ensayo de IFN- γ . La Figura 5 muestra las respuestas de IP-10 y IFN- γ específicas de antígeno en 7 pacientes con TB y un ensayo negativo o indeterminado de QFT-IT. Las respuestas de IFN- γ específicas de antígeno, determinadas por QFT-IT ELISA, variaban entre 0 - 12,8 pg/ml mientras, las respuestas de IP-10 específicas de antígeno variaban entre 0 - 532 pg/ml. De los 7 pacientes, 3 tampoco tenían sensibilidad de IP-10 con una respuesta específica de antígeno por debajo de 10 pg/ml, mientras que los otros 4 pacientes respondían con un nivel mediano de IP-10 de 318 pg/ml (intervalo 196 - 532 pg/ml). De los 4 pacientes con un ensayo negativo de QFT-IT y respuesta positiva de IP-10, 2 estaban infectados conjuntamente con VIH con un recuento de células de CD4 de 32 células/ μ l y 300 células/ μ l respectivamente. La liberación de IP-10 específica de mitógeno era alta en todos los donantes variando entre 394 y 2800 pg/ml. Sorprendentemente estos hallazgos subrayan la mayor sensibilidad de IP-10 basada en los ensayos in vitro comparado con los ensayos basados en IFN- γ

35

Tabla 6

| Donante n° | País ^a | Edad (años) | Diagnóstico ^b | Microscopía/cultivo | VIH | CD4 (células/ μ l) | IFN- γ (pg/ml) ^c | Antígenos | Mitógeno | Resultado de QFT-IF ^d | IP-10 (pg/ml) ^c | Antígenos | Mitógeno | Resultado ^e de IP-10 |
|------------|-------------------|-------------|--------------------------|---------------------|------|------------------------|------------------------------------|-----------|----------|----------------------------------|----------------------------|-----------|----------|---------------------------------|
| 1 | GB | 50 | pTB | +/n. d ^g | pos | 300 | 8 | 7 | 32 | neg | 72 | 383 | 520 | Pos |
| 2 | GB | 45 | pTB | +/n. d | pos | 333 | 13 | 13 | 596 | neg | 97 | 106 | 757 | Neg |
| 3 | GB | 50 | pTB | +/n. d | pos | n. d | 7 | 10 | 1446 | neg | 98 | 107 | 2800 | Neg |
| 4 | DK | 39 | ep TB | +/+ | pos | 787 | 3 | 2 | 1051 | neg | 29 | 39 | 2800 | Neg |
| 5 | DK | 36 | pTB | +/+ | neg | n. d | 38 | 44 | 249 | neg | 716 | 1040 | 2800 | Pos |
| 6 | DK | 41 | pTB | +/+ | n. d | n. d | 7 | 20 | 291 | neg | 31 | 227 | 556 | Pos |
| 7 | DK | 26 | Ep TB | +/+ | pos | 32 | 20 | 28 | 30 | Ind. ^h | 301 | 834 | 394 | Pos |

Tabla 6. Pacientes con resultado de ensayo de QFT-IT de TB activo y negativo o indeterminado se sometieron a ensayo para determinar la sensibilidad de IP-10.

a GB - Guinea Bissau; DK - Dinamarca

b pTB - TB pulmonar, epTB - TB extrapulmonar

c Sangre entera se estimuló 20 - 24 horas con solución salina, antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP10, y TB 7.7) o mitógeno (PHA). La producción de citoquina se midió mediante ELISA (IFN- γ) y multiplex (IP-10).

d Una respuesta positiva de QFT-IT se definió como una respuesta específica de antígeno de 17,5 pg/ml por encima de la nula de acuerdo con las directrices del fabricante.

e Una respuesta positiva de IP-10 se definió como una respuesta específica de antígeno de IP-10 de 36 pg/ml por encima de la nula arbitrariamente basado en los resultados medios de 11 controles sanos + 3 desviaciones estándar (pacientes del ejemplo 4)

g n.d. - no hecho

h indeterminado

Ejemplo 11

Se puede generar una respuesta vigorosa de IP-10 específica de antígeno en incubación corta y larga

5 En la tabla 7 los inventores presentan la respuesta no estimulada y estimulada por antígeno de un paciente de TB típico a las 6 – 120 h de incubación. Como se puede observar a partir de la tabla 7 es posible inducir respuestas de IP-10 con estimulación de antígeno, en muy poco tiempo de incubación. >Ing se produce a las 6 h y se mantienen respuestas muy altas 3 - 6 ng durante 120 horas de incubación. Estos hallazgos demuestran que la realización del ensayo de IP-10 es muy robusta y se puede realizar en tiempos muy cortos (< 6 h) y muy largos de incubación

Tabla 7

| Tiempo | IP-10 (pg/ml) | |
|--------|-----------------|-----------|
| Horas | Solución salina | Antígenos |
| 6 | 93 | 1173 |
| 12 | 117 | 3467 |
| 24 | 93 | 5467 |
| 48 | 96 | 5867 |
| 120 | 80 | 613250 |

10

Tabla 7. Respuestas no estimuladas (solución salina) y estimuladas por antígeno de un paciente de TB típico examinado a las 6 - 120 h de incubación.

Ejemplo 12

Se pueden generar respuestas vigorosas de IP-10 específica de antígeno en un intervalo de temperaturas de incubación

15

Como se puede ver en la tabla 8 es posible inducir respuestas de IP-10 con estimulación de antígeno en un amplio intervalo de temperaturas. > 200 pg/ml de IP-10 específica de antígeno se producen a 30 °C, indicando que es posible la incubación por debajo de 30 °C, y que la incubación a temperaturas en el intervalo de por ejemplo 30-37 °C generarán fuertes respuestas específicas de antígeno.

20

Tabla 8

| Temperatura (°C) | Solución salina | Antígenos |
|------------------|-----------------|-----------|
| 20,0 | 8 | 6 |
| 30,0 | 4 | 221 |
| 37,0 | 5 | 852 |

Tabla 8. Respuestas no estimuladas y estimuladas por antígeno de un paciente de TB típico examinado a las 24 h de incubación a 20 - 37 °C. Los valores de IP-10 están en pg/ml

Ejemplo 13

Se pueden diluir pequeñas cantidades de sangre entera antes de la incubación y todavía generan fuertes respuestas de IP-10

25

Muestras de 1ml (1:0), 0,5ml (1:1) y 0,1ml (1:10) de sangre entera se diluyeron en RPMI-1640 hasta un volumen total de 1ml. La sangre entera diluida se estimuló en tubos QFT-IT 24 h. Los valores no están corregidos para el factor de dilución. Como se puede ver en la tabla 9 es posible diluir sangre entera en RPMI-1640 antes de la incubación y todavía generan respuestas específicas de antígeno de IP-10s > 80pg/ml. Esto indica que la dilución adicional es posible y se puede desarrollar un kit de ensayo que usa muy pocas cantidades de sangre o células.

30

Tabla 9

| Dilución | N | A |
|----------|----|------|
| 1:0 | 93 | 5467 |
| 1:1 | 40 | 2933 |
| 1:10 | 13 | 93 |

Tabla 9. Respuestas no estimuladas y estimuladas por antígeno de un paciente de TB típico usando pequeñas alícuotas de sangre entera diluida en RPMI-1640. Los niveles de IP-10 están en pg/ml

5

Ejemplo 14

Estabilidad de IP-10 a 25 °C

Alícuotas de plasma de sangre entera estimulada por PHA de cuatro donantes se almacenaron a 25 °C durante ½ h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, o 24 h antes de análisis. En la tabla 10 es evidente que IP-10 es una molécula muy estable que no se desintegra incluso a las 24 h a 25 °C.

10

Tabla 10

| | | Donante 1 | Donante 2 | Donante 3 | Donante 4 |
|-------------------|------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Tiempo a 25 °C | 0 h | 63 | 769 | 482 | 127 |
| | ½ h | 57 | 649 | 471 | 115 |
| | 1 h | 72 | 754 | 461 | 116 |
| | 2 h | 68 | 728 | 438 | 115 |
| | 4 h | 62 | 727 | 487 | 126 |
| | 8 h | 66 | 693 | 459 | 137 |
| | 24 h | 77 | 763 | 455 | 149 |

Tabla 10. Estabilidad de IP-10 a 25 °C (las mediciones están en pg/ml)

Ejemplo 15

Estabilidad de IP-10 a 5 °C.

Alícuotas de plasma de sangre entera estimulada por PHA de cuatro donantes se almacenaron a 5 °C durante 12 h, 24 h, 72 h, 1474 h, o 216 h (9 días) antes del análisis. En la tabla 11 es evidente que IP-10 es una molécula muy estable que no se desintegra incluso a las 216 h (9 días) a 5 °C.

15

Tabla 11

| | | Donante 1 | Donante 2 | Donante 3 | Donante 4 |
|-------------------|------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Tiempo a 25 °C | 0 h | 63 | 769 | 482 | 127 |
| | 12 h | 71 | 646 | ausente | 134 |
| | 1 d | 69 | 664 | 501 | 144 |
| | 3 d | 78 | 784 | 539 | 166 |
| | 6 d | 81 | 883 | 495 | 187 |
| | 9 d | 93 | 728 | 520 | 183 |

Tabla 11. Estabilidad de IP-10 a 5°C.

Ejemplo 16

5 Estabilidad de IP-10 en ciclos de congelación y descongelación

Alícuotas de plasma de sangre entera estimulada por PHA de cuatro donantes se congelaron (*80 °C) y se descongelaron hasta 5x antes del análisis. En la tabla 12 es evidente que IP-10 es una molécula muy estable a la congelación/descongelación que no se desintegra incluso a 5 ciclos de congelación.

Tabla 12

| | | Donante 1 | Donante 2 | Donante 3 | Donante 4 |
|--|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ciclos de congelación descongelación | x 0 | 63 | 769 | 482 | 127 |
| | x 1 | 66 | 879 | 388 | 131 |
| | x 2 | 74 | 793 | 513 | 122 |
| | x 3 | 70 | 795 | 486 | 126 |
| | x 4 | 65 | 952 | 459 | 126 |
| | x 5 | 80 | 746 | 483 | 142 |

Tabla 12. Estabilidad de IP-10 a la congelación - descongelación.

10

Ejemplo 17

IP-10 como biomarcador de diagnóstico es independiente de la plataforma.

Los niveles de IP-10 no solamente se pueden medir usando Luminex, en el ejemplo 17 los inventores han medido muestras de 4 pacientes con TB activa y 4 controles sanos usando la tecnología ELISA (Biosource).

15

Como se puede apreciar en la tabla 13 los cuatro pacientes producen IP-10 específica de antígeno por encima de 457pg/ml mientras que todos los controles producen IP-10 por debajo de 13 pg/ml.

Tabla 13

| | IP-10 específica de antígeno (pg/ml) |
|------------|--------------------------------------|
| Control 1 | 9 |
| Control 2 | 13 |
| Control 3 | 0 |
| Control 4 | 0 |
| Paciente 1 | 457 |
| Paciente 2 | 626 |
| Paciente 3 | 719 |
| Paciente 4 | 620 |

5 Tabla 13. Producción de IP-10 específica de antígeno de 4 controles y 4 pacientes medida mediante tecnología ELISA.

Ejemplo 18

Combinación de medidas de IP-10 y otros biomarcadores conocidos para crear un marcador combinado más fuerte, e incrementar el número de respuestas positivas.

10 Por razones desconocidas algunos individuos responden fuertemente con un biomarcador y no otro después de la exposición a antígenos. Por ejemplo algunos individuos no pueden mostrar respuestas de IP-10 ni de IFN- γ , o solamente producen bajos niveles de IP-10 o IFN- γ . En este caso la medición simultánea de dos, tres, cuatro o más biomarcadores incrementarán la sensibilidad del ensayo e incrementará el número de respuestas positivas. Mediante la combinación de IP-10 y por ejemplo mediciones de IFN- γ es por lo tanto posible preparar predicciones de diagnóstico que son menos vulnerables a una única anergia de biomarcador.

15 Un planteamiento de esta estrategia de biomarcador combinado se observa en la tabla 15 cuando los resultados de IP-10 y Quantiferon de la tabla 6 se combinan en la siguiente matriz: si la reacción del paciente es positiva a al menos uno de los ensayos, entonces el paciente se considera infectado. En el ejemplo presentado no existen sujetos con respuesta negativa de QFT-IT que son positivos mediante el ensayo de IP-10.

Tabla 14

| Paciente nº | Resultado de QFT | Resultado de IP-10 | Resultado de QFT-IT/IP-10 combinado |
|-------------|------------------|--------------------|-------------------------------------|
| 1 | neg | Pos | Pos |
| 2 | neg | Neg | Neg |
| 3 | neg | Neg | Neg |
| 4 | neg | Neg | Neg |
| 5 | neg | Pos | Pos |
| 6 | neg | Pos | Pos |
| 7 | Ind | Pos | Pos |

20 Tabla. Se han combinado los resultados de ensayo de QFT-IT y de IP-10 y se han interpretado como que si un paciente es positivo en al menos un ensayo entonces el paciente se considera infectado. El punto de corte

para ensayo de IP-10 se definió como una respuesta específica de antígeno de IP-10 de 36 pg/ml por encima de nula, arbitrariamente basado en los resultados medios de 11 controles sanos + 3 desviaciones estándar (pacientes del ejemplo 4),

5 **[0308]** Otro procedimiento más complejo de construcción de un biomarcador combinado se observa en la tabla 16. Las respuestas de IP- 10 y IFN- γ específicas de antígeno se combinan mediante adición y multiplicación. Se evaluaron siete controles no expuestos y 8 pacientes con TB activa. En la tabla 14 los inventores observan la mediana y el intervalo de las respuestas específicas de antígeno de IP-10 y IFN- γ , y la mediana y el intervalo de respuestas añadidas y multiplicadas de IP-10 e IFN- γ . Mediante adición el tramo entre el mayor control que responde y el menor paciente que responde se incrementa desde 62 pg/ml para IFN- γ , y 1727 pg/ml para IP-10, hasta 1863 pg/ml, y mediante la multiplicación hasta 164642 (pg/ml)². Este incremento severo sorprendente en el tramo mediante multiplicación, también incrementó el número de veces de diferencia basado en la media hasta un asombroso 379274 veces, y esto se compara con la IP- 10 específica de antígeno que tenía 619 veces de diferencia entre pacientes y controles, o IFN- γ que tenía 1074 veces de diferencia.

15 Tabla 15

| | | IP-10 específica de antígeno | IFN- γ específico de antígeno | Adición | Multiplicación |
|-----------------|---------|------------------------------------|--|---------|----------------|
| Controles n = 7 | Mediana | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | Min | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Máx | 63 | 2 | 62 | 62 |
| Pacientes n = 8 | Mediana | 8779 | 215 | 9074 | 2019761 |
| | Min | 1800 | 64 | 1865 | 164704 |
| | Máx | 24355 | 1018 | 25373 | 25146884 |

20 Tabla 15. Se añadió o se multiplicó IP-10 específico de antígeno e IFN- γ específico de antígeno para construir una combinación de IP-10/IFN- γ biomarcador. Las mediciones específicas de antígeno <0 se normalizaron hasta 0,

Ejemplo 19

Diagnosic de infección por Clamydia trachomatis usando el ensayo de IP-10

25 Se aislaron PBMC de 7 pacientes con infección por Clamydia trachomatis y de 7 donantes sin ninguna historia reseñada de infección por Clamydia. Se estimularon PBMC en cultivo de 5 días y los sobrenadantes se analizaron para determinar la producción de IP-10 usando luminex y la producción de IFN- γ usando ELISA.

30 En la tabla 16 los inventores observaron que los altos niveles (> 0,5ng/ml) de IP-10 de sobrenadante de cultivo de PBMC se inducen mediante la estimulación con antígeno de extracto de Clamydia Trachomatis serovar D en pacientes que padecen infección genital por Clamydia trachomatis. Es evidente que algunos controles responden a esta estimulación no específica, pero que los niveles son menores. Existe una alta producción de IP-10 específica de antígeno > 0,5 ng/ml.

En conclusión IP-10 es un biomarcador novedoso para la infección por Clamydia

Tabla16

| | | IP-10 (pg/ml) | | | IFN- γ (pg/ml) | | |
|-----------|-------------|---------------|------|------------------|-----------------------|-------|------------------|
| | | Nula | Ag | Específica de Ag | Nula | Ag | Específica de Ag |
| Controles | Control 01 | 0 | 252 | 252 | 128 | 2184 | 2056 |
| | Control 10 | 45 | 14 | -31 | 148 | 146 | -2 |
| | Control 18 | 226 | 820 | 594 | 0 | 474 | 474 |
| | Control 20 | 282 | 998 | 716 | 4 | 2514 | 2510 |
| | Control 25 | 66 | 1240 | 1175 | 30 | 296 | 266 |
| | Control 28 | 0 | 2 | 2 | 40 | 112 | 72 |
| | Control 31 | 10 | 4 | -6 | 84 | 162 | 78 |
| | Mediana | 45 | 252 | 252 | 40 | 296 | 266 |
| Pacientes | Paciente 01 | 14 | 2472 | 2458 | 0 | 7808 | 7808 |
| | | 2 | 1449 | 1446 | 84 | 2976 | 2892 |
| | Paciente 03 | 498 | 3725 | 3227 | 10 | 8206 | 8196 |
| | Paciente 04 | 13 | 1217 | 1304 | 36 | 7516 | 7480 |
| | Paciente 05 | 21 | 4707 | 4686 | 0 | 10214 | 10214 |
| | Paciente 12 | 1 | 503 | 502 | 4 | 6264 | 6260 |
| | Paciente 18 | 58 | 1680 | 1621 | 10 | 4016 | 4006 |
| | Paciente 02 | | | | | | |
| | | Mediana | 14 | 1680 | 1621 | 10 | 7516 |

5 **Tabla 16. Niveles de IP-10 e IFN- γ nulos, de antígeno y específicos de antígeno se indujeron en un cultivo de 5 días de PBMC**

Referencias

Abramo C, Meijgaarden KE, García D, Franken KL, Klein MR, Kolk AJ et al. Monokine induced by interferon gamma and IFN-gamma respuesta to a fusion protein of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis pacientes. Microbes

10 Bourgarit, A., G. Carcelain, V. Martinez, C. Lascoux, V. Delcey, B. Gicquel, E. Vicaut, P. H. Lagintervalo, D. Sereni, and B. Autran. 2006. Explosion of tuberculin-specific Thi-respuestas induces immune restoration syndrome in tuberculosis and VIH co-infected pacientes. AIDS 20:F1-F7.

15 Hughes, A. J., P. Hutchinson, T. Gooding, N. J. Freezer, S. R. Holdsworth, and P. D. Johnson. 2005. Diagnosis of Mycobacterium infección por tuberculosis using ESAT-6 and intracellular citoquina cytometry. Clin. Exp. Inmunol. 142: 132-139.

Pai, M., R. Joshi, S. Dogra, D. K. Mendiratta, P. Narang, S. Kalantri, A. L. Reingold, J. M. Colford Jr, L. W. Riley, and D. Menzies. 2006. Serial Testing of Health Care Workers for Tuberculosis using Interferon- γ Ensayo. Am. J. Respir. Crit Care Med.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la diagnosis de una infección provocada por mycobacterias que comprende las etapas de
- 5 a) incubar una muestra que comprende células T obtenidas de un ser humano con al menos un antígeno de ensayo de péptido o proteína específico de mycobacterias con la condición de que dicho antígeno de ensayo no sea PPD
- b) determinar la respuesta inmune mediada por células específica de antígeno de ensayo midiendo el nivel de IP-10 en dicha muestra,
- c) comparar el nivel determinado de IP-10 con un nivel de referencia, y
- 10 d) determinar si es probable que dicho ser humano esté infectado con al menos una mycobacteria, si el nivel de IP-10 determinado es igual a o está por encima del nivel de referencia y/o determinar si es probable que dicho mamífero no esté infectado si dicho nivel de IP-10 determinado está por debajo del nivel de referencia.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra se divide en al menos dos fracciones y
- 15 a) se incuba la primera fracción de la muestra con al menos un antígeno de ensayo de péptido o proteína específico de mycobacterias para generar una muestra de respuesta
- b) se incuba la segunda fracción de la muestra con una solución inactiva para generar una muestra nula
- c) se determina el nivel de IP-10 en las dos fracciones
- 20 d) se determina la respuesta inmune dependiente de antígeno de ensayo mediada por células de la muestra restando el nivel de IP- 10 determinado en la muestra nula de la IP-10 determinada en la muestra de respuesta
- e) se compara la respuesta inmune mediada por células dependiente del antígeno de ensayo o un valor derivado de la misma con el nivel de referencia o un valor derivado del mismo, y
- 25 f) se determina si es probable que dicho mamífero tenga una infección si dicho nivel de respuesta inmune mediada por células específica de antígeno de ensayo es igual a o está por encima del nivel de referencia y/o se determina si es probable que dicho ser humano no tenga una infección si dicho nivel de respuesta inmune mediada por células específica de antígeno de ensayo determinado está por debajo del nivel de referencia.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además la división de la muestra en 3 fracciones e incubar la tercera fracción de la muestra con un activador de células T para generar un control positivo.
- 30 4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la infección es una infección activa, una infección latente, una infección reciente y/o una infección latente a largo plazo.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mycobacteria se selecciona entre el grupo que consta de organismos complejos de *M. tuberculosis*, mycobacterias donde la región de diferencia (RD1) no se ha suprimido y mycobacterias patógenas para los seres humanos.
- 35 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno de ensayo de péptido o proteína específico de mycobacterias se selecciona entre el grupo que consta de antígenos RD-1, ESAT-6, CFP10, TB7.7, Ag 85 y HSP-65.
- 40 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra se obtiene a partir de sangre.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es sangre entera.
- 45 9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende
- a) determinar el nivel de MCP-1 en respuesta a la estimulación específica de antígeno de ensayo,
- b) combinar el nivel determinado de IP-10 y MCP-1, y

c) comparar dicho nivel combinado con un nivel de referencia combinado.

10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además

5

a) determinar el nivel de INF- γ y opcionalmente MCP-1 y/o IL-2 en respuesta a la estimulación específica de antígeno de ensayo,

b) combinar el nivel determinado de IP-10 and INF- γ y opcionalmente MCP-1 y/o IL-2, y

c) comparar dicho nivel combinado con un nivel de referencia combinado.

10

11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la medición del nivel de IP-10 se determina mediante una técnica inmunológica seleccionada entre el grupo que consta de ELISA, Luminex, Multiplex, inmunotransferencia, ensayos de TRF, ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, técnicas de inmunoensayo enzimático homogéneo (EMIT), ensayo RAST, radioinmunoensayos, inmunofluorescencia, ensayos inmunológicos con tira reactiva seca (Dry Stick), ensayo cromatográfico con tira reactiva (Stick) y ensayo inmunocromatográfico.

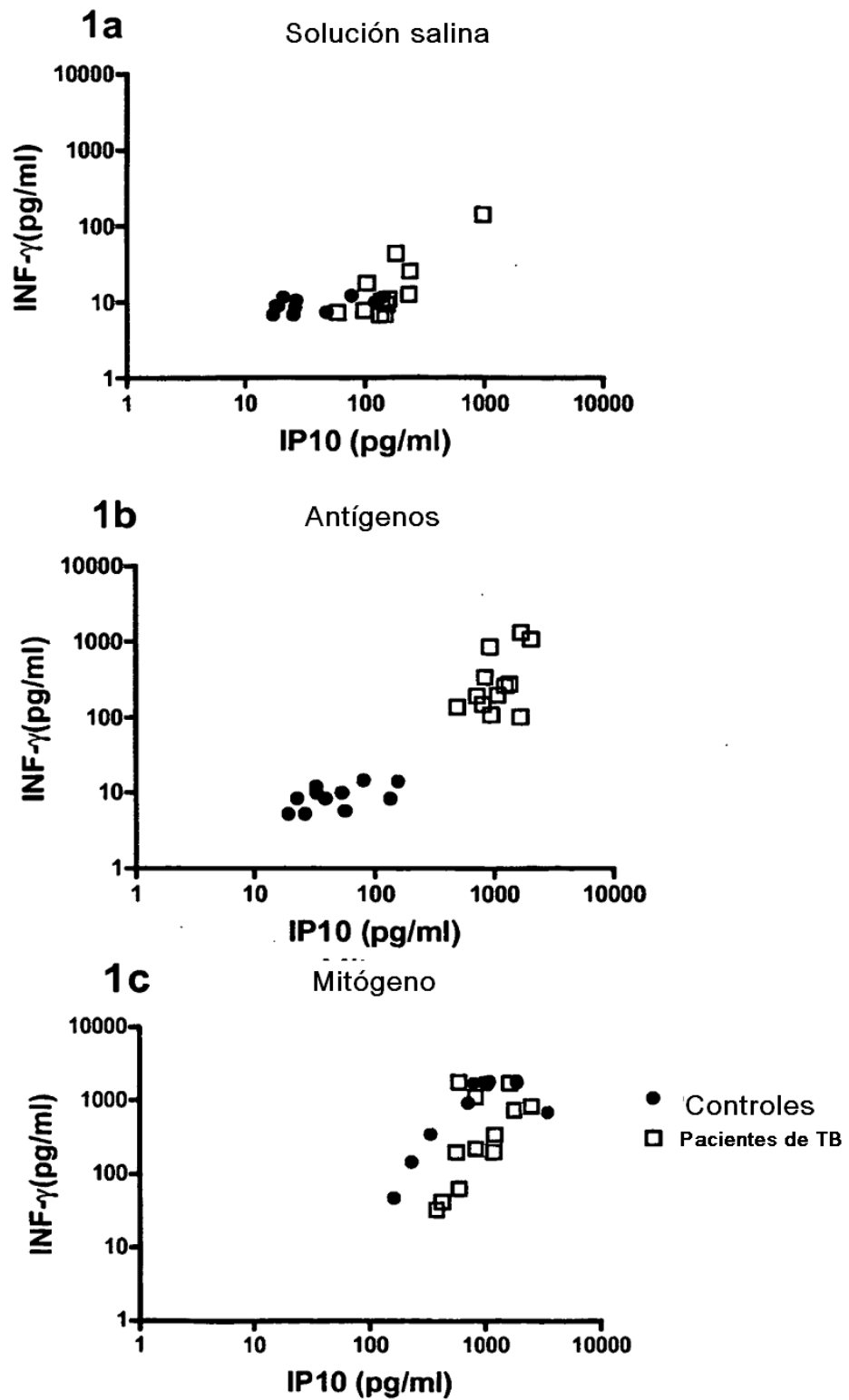


Fig. 1

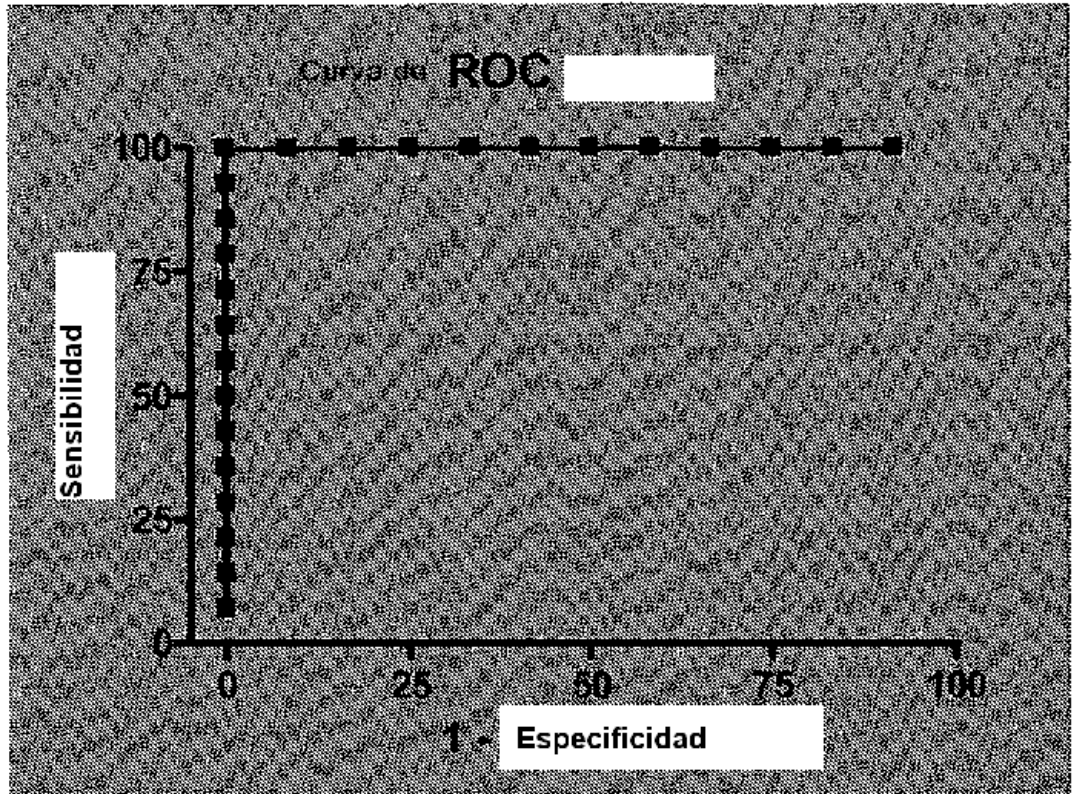


Fig. 3

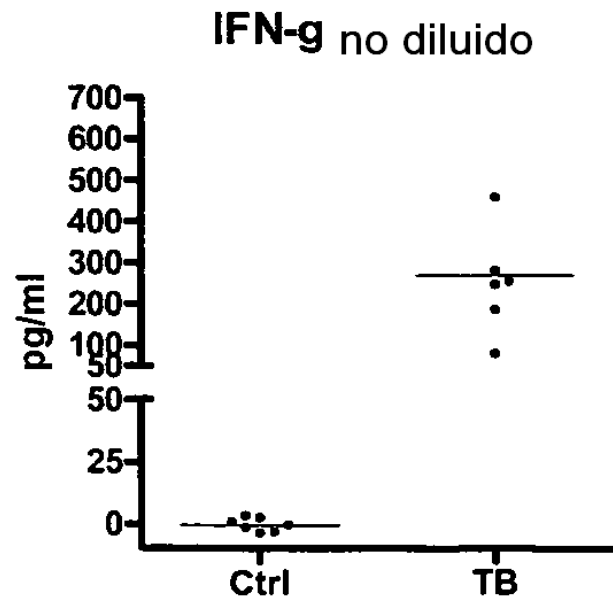
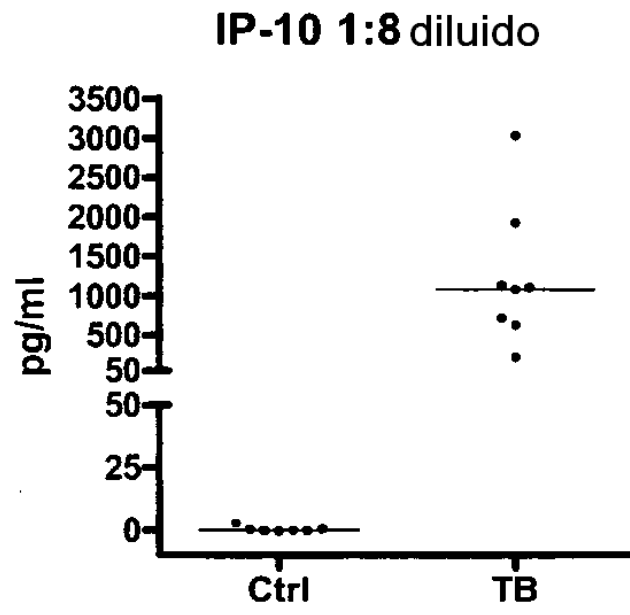


Fig. 4

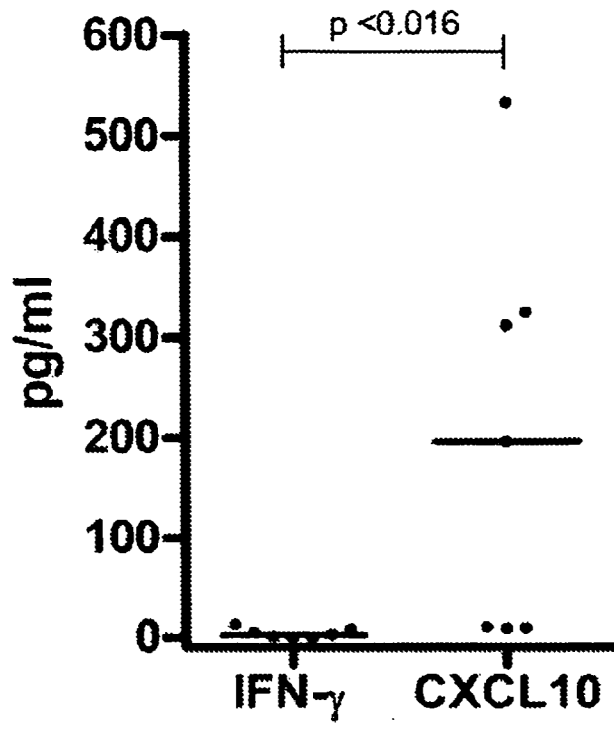


Fig. 5