



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 492**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07866799 .5**
96 Fecha de presentación : **13.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2094295**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Método para el diagnóstico y/o seguimiento de aspergilosis invasivas.**

30 Prioridad: **19.12.2006 IT MI06A2448**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2011

73 Titular/es:
Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia
Via dell'Università 4
41100 Modena, IT

72 Inventor/es: **Luppi, Mario;**
Barozzi, Patrizia;
Potenza, Leonardo y
Torelli, Giuseppe

74 Agente: **Morales Durán, Carmen**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico y/o seguimiento de aspergilosis invasivas

5 Descripción del resumen de la invención

La presente invención es un método para el diagnóstico de aspergilosis invasivas que comprende realizar un ensayo ELISPOT inmunoenzimático *in vitro* en el que el fluido biológico extraído del paciente se pone en contacto con un antígeno de *Aspergillus fumigatus*, que se caracteriza por comprender la verificación de la presencia de células T productoras de IFN- γ y células T productoras de IL-10 y/o la relación entre células T productoras de IFN- γ y células T productoras de IL-10.

En el método de acuerdo con la presente invención, dicho antígeno preferentemente es un antígeno extractivo de *Aspergillus fumigatus*; más preferentemente, dicho antígeno se obtiene a partir de conidios o hifas de *Aspergillus fumigatus*.

De acuerdo con una realización de la invención, dicho antígeno se obtiene por medio de los siguientes pasos:

- incubación de los conidios durante 3 días,
- recogida de los conidios por medio de lavado del cultivo fúngico con agua esterilizada,
- filtración y posterior centrifugación del líquido de lavado,
- eliminación del sobrenadante,
- congelación y posterior descongelación del sedimento de conidios,
- suspensión en agua esterilizada,
- ebullición y posterior centrifugación, y
- posible congelación.

De acuerdo con otra realización de la invención, dicho antígeno se obtiene por medio de los siguientes pasos:

- recogida de hifas de placas de cultivo mediante raspado y posterior suspensión en agua esterilizada,
- filtración y posterior centrifugación,
- eliminación del sobrenadante,
- congelación y posterior descongelación del sedimento del micete,
- homogeneización del micete en presencia de un volumen de perlas de material inerte (preferentemente perlas de vidrio) igual al volumen del micete,
- centrifugación
- posible congelación.

De acuerdo con una realización de la invención, dicho fluido biológico se selecciona entre sangre, fluido de lavado broncoalveolar o fluido pleural.

De acuerdo con otra realización de la invención, dicho fluido biológico se selecciona entre todas las células mononucleares de la sangre, del fluido de lavado broncoalveolar, del fluido pleural o linfocitos T de la sangre, del fluido de lavado broncoalveolar, o del fluido pleural.

En el método de acuerdo con la presente invención, el valor umbral para IFN- γ o IL-10 está preferentemente en el intervalo de 15-25 SFC; más preferentemente, dicho valor umbral es 20 SFC.

Técnica anterior

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) representan una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes afectados por hemopatías malignas, sometidos no sólo a trasplantes de médula alogénicos sino también a quimioterapia convencional. El riesgo de muerte en pacientes afectados por IFI alcanza incluso porcentajes del 90%.

El agente etiológico responsable de las IFI se representa por hongos de la especie *Aspergillus*, que constituyen casi el 90% de todas las infecciones invasivas. Las causas de esta alta mortalidad estriban en la ausencia de métodos de diagnóstico que permitan un diagnóstico de Aspergilosis Invasiva (AI). De hecho, los instrumentos disponibles para el hematólogo clínico están limitados por la invasividad, lentitud, baja sensibilidad, falta de estandarización y cinética variable (Hope WW 2005; Mennink-Kersten M 2004; Patterson TF 2005).

Los métodos que se usan actualmente para el diagnóstico de aspergilosis invasivas son el examen histológico, la tomografía axial computarizada de alta resolución de tórax (HRCT), exámenes de cultivos, exámenes serológicos (galactomanano, 1,3-beta-glucano) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ácidos nucleicos de hongos.

Sin embargo, sólo el examen histológico y el examen de cultivos proporcionan una confirmación absoluta de AI, pero

tienen límites de invasividad y baja sensibilidad (son positivos en un porcentaje menor de aproximadamente un 30%). La HRCT no es específica, mientras que el GM tiene una sensibilidad extremadamente variable (en un intervalo comprendido entre el 30% y el 100%) ya que se ve influenciada por numerosos factores que limitan su aplicación, incluyendo el uso de la profilaxis antifúngica y/o la dieta del paciente. Tanto los beta-glucanos como la PCR carecen de estandarización y tienen cinéticas completamente impredecibles. Además, la detección del ADN de *Aspergillus* a través de PCR se obstaculiza por las dificultades de comprensión de la liberación y cinética del ADN del hongo, además de las barreras técnicas (Hope WW, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2005; 5: 609-622).

Ciertos estudios recientes, primero en roedores y después también en seres humanos, demostraron que la inmunidad adaptativa, o la representada por las células T, realiza un papel predominante en la defensa del hospedador contra los hongos (Cenci E 1997; Hebart H 2002; Romani L 2004). En particular, una inmunidad mediada por células polarizada con células T auxiliares de tipo 1 (TH1), productoras de interferón-gamma (IFN- γ) protege contra las infecciones fúngicas, especialmente AI; mientras que una inmunidad mediada por células polarizada con células T auxiliares de tipo 2 (TH2), productoras de interleucina 10 (IL-10), es permisiva con respecto a AI (Cenci E 1997; Hebart H 2002; Romani L 2004).

El método ELISPOT (*ElisaSpot* o *Ensayo InmunoSpot ligado a Enzimas*) ha mostrado ser un instrumento sensible y específico en el diagnóstico de infecciones microbacterianas de tuberculosis o en infecciones de origen viral, tanto en sujetos inmunocompetentes como en sujetos inmunodeprimidos (Lalvani 2001), mediante la investigación de células T específicas de microbacterias, o para el aislamiento de células T específicas para el virus de Epstein-Barr en pacientes con trasplante renal (Comoli 2002).

ELISPOT es un ensayo basado en la respuesta inmunológica celular hacia un antígeno específico. Dicho método generalmente se realiza en placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos, en los que se incuban las células y el antígeno específico durante 6-48 horas.

Durante dicho periodo se produce la respuesta celular y se producen las citocinas específicas, de acuerdo con el tipo de anticuerpo/antígeno usado, que genera manchas que se detectan y cuentan mediante un software común de análisis de imágenes.

En la solicitud de patente europea EP0957359 (Volkmar et al.), incorporada en la presente memoria con fines de referencia, se describe el método ELISPOT para una evaluación genérica de la actividad de células sanguíneas.

En la solicitud de patente internacional WO98/23960 (Lalvani et al.), incorporada en la presente memoria con fines de referencia, se describe el método ELISPOT aplicado a los linfocitos T para el diagnóstico o seguimiento de enfermedades tales como hepatitis B, hepatitis C, tuberculosis, malaria, VIH o gripe.

En la solicitud de patente internacional WO00/26248 (Lalvani et al.), incorporada en la presente memoria con fines de referencia, se describe el método ELISPOT aplicado a los linfocitos T reactivos con los antígenos procedentes de la proteína ESAT-6 expresada por *Mycobacterium tuberculosis*, para el diagnóstico de la tuberculosis o incluso únicamente en el contacto del hospedador con el patógeno (enfermedad latente).

En la solicitud de patente internacional WO2004/005925 (Lalvani et al.), incorporada en la presente memoria con fines de referencia, se describe otro método ELISPOT aplicado a los linfocitos T reactivos no sólo con los antígenos derivados de ESAT-6 sino también de la proteína CFP-10.

Por lo tanto, el método ELISPOT se ha utilizado hasta ahora para infecciones y enfermedades de origen viral, o para *Mycobacterium tuberculosis*.

Trull et al., Journal of Clinical Pathology, Vol. 38, nº 9, 1985, páginas 1045-1047 y el documento US 2002/061544 describen métodos para el diagnóstico de aspergilosis invasivas por medio de ensayos inmunoenzimáticos con un antígeno de *Aspergillus fumigatus*.

En Gaziano et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 48, nº 11, 2004, páginas 4414-4421, se ha usado el ensayo ELISPOT para calcular el número de esplenocitos que producen IFN-g inducido por una sola infusión de Pentraxina 3 (PTX-3) en ratones trasplantados antes o después de la infección con *Aspergillus fumigatus*.

Bozza et al., Blood, Vol. 102, nº 10, 2003, páginas 3807-3814 describe una vacuna de células dendríticas contra la aspergilosis invasiva en trasplantes hematopoyéticos alogénicos.

In Ramadan et al., Clinical and Experimental Immunology, Vol. 139, febrero de 2005, páginas 257-267, se ha usado ELISPOT para detectar la frecuencia de células mononucleares de sangre periférica capaces de responder a péptidos solapantes de *Aspergillus* que proceden de la proteína Aspf16 en donantes sanos, para comprender los factores que determinan la respuesta inmune específica contra *Aspergillus* (pág. 265, columna 2, segundo párrafo).

En Ramadan et al., Clinical and Experimental Immunology, Vol. 140, abril de 2005, páginas 81-91, se ha usado ELISPOT para detectar la presencia de células T positivas para CD4 o positivas para CD8, específicas para epítopos restringidos al HLA de clase I de la proteína Aspf16 mencionada previamente en donantes sanos.

- 5 El documento WO03/018051 informa sobre una vacuna fúngica disponible por vía oral. El ensayo ELISPOT se cita como un método adicional para ensayar el efecto de la inmunización con la vacuna.

En el documento WO2005/107791, se usa ELISPOT para detectar esplenocitos de ratón que producen IFN- γ después de la infusión de PTX-3.

10

Descripción detallada de invención

Ahora se ha descubierto que ciertos ensayos inmunoenzimáticos, en particular ELISPOT, pueden usarse ventajosamente para el diagnóstico, en particular un diagnóstico precoz de infecciones fúngicas, en particular en el caso de la aspergilosis invasiva.

15

El objeto de la invención, de hecho, es el de usar dichos ensayos, en particular el ensayo ELISPOT, para identificar y contar células T específicas de *Aspergillus*, para conseguir una detección sencilla o para determinar una relación cuantitativa entre los productores de IFN- γ y los productores de IL-10 con la intención de definir el riesgo de infección, para el diagnóstico de aspergilosis invasiva.

20

El objeto de la presente invención, por lo tanto, es un método para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva que comprende realizar un ensayo inmunoenzimático *in vitro* en placas de microtitulación, tales como, por ejemplo, del tipo de 96 pocillos, caracterizado por poner el fluido biológico extraído del paciente en contacto con un antígeno de *Aspergillus fumigatus*, en particular un antígeno extractivo de *Aspergillus fumigatus*.

25

De acuerdo con la presente invención, dicho método incluye la identificación y recuento de células T específicas de *Aspergillus* para verificar la presencia y/o definir una relación entre los productores de IFN- γ y los productores de IL-10.

30

El valor umbral para IFN- γ o IL-10 que permite definir el resultado positivo del método de acuerdo con la presente invención está en el intervalo de 15-25 SFC (*Células Formadoras de Manchas*), preferentemente 20 SFC.

De acuerdo con la presente invención, dicho ensayo inmunoenzimático es ELISPOT (ElisaSpot o Ensayo InmunoSpot ligado a Enzimas) y dicho antígeno, preferentemente un antígeno extractivo, puede obtenerse a partir de conidios de *Aspergillus fumigatus* o a partir de hifas de *Aspergillus fumigatus*.

35

Los conidios (o conidiosporas) son estructuras reproductoras predominantemente unicelulares que se forman en la parte superior de las hifas que, a su vez, son filamentos unicelulares o pluricelulares de forma cilíndrica, que se disponen en la parte superior de otras formas, constituyendo el micelio o el cuerpo vegetativo del hongo.

40

En particular, de acuerdo con una realización de la presente invención, dicho antígeno se obtiene a partir de conidios de *Aspergillus fumigatus* que se recogen después de tres días de cultivo, preferentemente en medio de agar sabouraud, se filtran a través de una gasa esterilizada y finalmente se inactivan con calor durante 1 hora a 100°C. Posteriormente, se lavan en una solución salina (PBS) y se conservan a -20°C.

45

De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, dicho antígeno, preferentemente antígeno extractivo, se obtiene a partir de hifas de *Aspergillus fumigatus* que se homogeneizan, por ejemplo, usando un mortero con perlas de un material inerte, preferentemente perlas de vidrio en un tampón, preferentemente Tris-HCl 50 mM con un pH de aproximadamente 7,5. El extracto de proteínas obtenido de esta manera se recupera después de una centrifugación entre 10 y 20000 rpm durante aproximadamente 10 minutos y se conserva a una temperatura en el intervalo de aproximadamente -30 a -10°C, preferentemente -20°C.

50

Para los fines de la presente invención, por lo tanto, con la expresión "antígeno de *Aspergillus fumigatus*" se entienden constituyentes de la estructura fúngica tratados de tal manera que pueden inducir una respuesta de células T específicas.

55

El fluido biológico usado de acuerdo con el método de la presente invención puede ser sangre, fluido de lavado broncoalveolar (BAL) o fluido pleural de pacientes con riesgo de AI o ya infectados.

60

En particular, dicho fluido puede obtenerse a partir de una muestra intravenosa con citrato, preferentemente 20 ml, procedente de citrato de fluido pleural, preferentemente 20 ml, o de una muestra de fluido BAL citrada, preferentemente 30 ml.

Dicha sangre puede usarse de acuerdo con el método de la presente invención como sangre total o como linfocitos T aislados.

65

De acuerdo con la presente invención, la muestra de sangre, fluido pleural o fluido de lavado broncoalveolar se diluye con un volumen equivalente de medio de cultivo, por ejemplo, RPMI 1640, y después se somete a centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll, Lymphoprep) para separar la población de las células mononucleares (PBMC). Después de 2 lavados, por ejemplo en RPMI 1640, las células se congelan en nitrógeno líquido, preferentemente en presencia de DMSO al 20% y suero bovino fetal (FBS) al 50% para los experimentos del ELISPOT.

Las muestras de células después se descongelan lentamente en un baño con termostato a 35-40°C, preferentemente a 37°C. Se añade DNasa a una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml y se deja actuar a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. Las células se transfieren a un tubo de ensayo y se resuspenden delicadamente con aproximadamente 10 ml de medio RPMI 1640 añadido con aproximadamente un 5% de FBS que se añade gota a gota. Después de una primera centrifugación a aproximadamente 1000 rpm durante aproximadamente 10 minutos, el sedimento celular obtenido se resuspende otra vez en un medio de cultivo R10 (RPMI 1640; FBS al 10%; piruvato sódico al 1%; ampicilina al 1%; gentamicina al 0,5%, 18 UI/ml de IL-2) y después las células se cuentan en una cámara Burkner.

Para la separación de las células T CD3+, se usó el "Pan T cell Isolation Kit", humano, distribuido por Miltenyi Biotec S.r.l. (Calderara di Reno, Bologna, Italia). La separación de las células T CD3+ se realiza por reducción de las células no T (selección negativa). Las células no T marcadas con una mezcla de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (CD14, 16, 19, 36, 56, 123 y Glicoforina A) se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados con micropelotas magnéticas. El paso de las células marcadas (células no T) y células no marcadas (células T CD3+) a través de una columna MAC-MS (Miltenyi) en presencia de un campo magnético determina el paso de las células T CD3+ y el bloqueo de las células no T. El procedimiento de separación se realizó en muestras de células después de la descongelación, siguiendo las indicaciones descritas por Miltenyi.

De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, dicho antígeno puede obtenerse a partir de conidios de *Aspergillus fumigatus* que se recogen después de 2-4 días de cultivo (por ejemplo, en medio agar sabouraud) mediante lavado de la capa superficial del cultivo fúngico con agua esterilizada. El líquido de lavado obtenido se filtra a través de una gasa esterilizada y se somete a centrifugación entre 10000 y 15000 rpm, preferentemente a 12000 rpm durante 5-15 minutos, preferentemente 10 minutos. El sobrenadante se elimina y el sedimento de conidios obtenido de esta manera se congela en nitrógeno líquido durante aproximadamente 12 horas. Posteriormente, el sedimento de conidios se descongela, se resuspende en agua esterilizada y se lleva a ebullición en un baño de agua durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Después de la centrifugación (aproximadamente 10 minutos a 12000 rpm) para eliminar el sobrenadante, el sedimento de conidios se resuspende en aproximadamente 500 microlitros de PBS 1X. Los conidios obtenidos de esta manera se usan en el experimento Elispot a la concentración de aproximadamente 100.000 conidios/ml.

El antígeno obtenido puede usarse inmediatamente o puede almacenarse por medio de congelación a aproximadamente -20°C y usarse después.

De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, dicho antígeno extractivo puede obtenerse a partir de hifas de *Aspergillus fumigatus* que se recogen por raspado de varias columnas de cultivo con una hoja de bisturí y se resuspenden en agua esterilizada. Después de agitar con vórtice, se procede con la filtración a través de una gasa esterilizada para eliminar el posible agar. El micete obtenido de esta manera se somete a centrifugación a aproximadamente 15000 rpm durante aproximadamente 10 minutos, después se elimina el sobrenadante, y se congela en nitrógeno líquido durante aproximadamente 12 horas. Posteriormente, el micete no congelado se homogeneiza en un mortero en presencia de un volumen de perlas de material inerte, preferentemente perlas de vidrio, igual al del micete y en un tampón, preferentemente Tris-HCl 50 mM, a un pH de aproximadamente 7,5. El extracto de proteína obtenido de esta manera se recupera después de la centrifugación a aproximadamente 14000 rpm durante aproximadamente 20 minutos. Después de la evaluación del contenido de proteínas, el extracto de las hifas se usa en el experimento Elispot a la concentración de aproximadamente 6-10 microgramos/ml.

El antígeno obtenido puede usarse inmediatamente o puede almacenarse mediante congelación a aproximadamente -20°C y usarse después.

Parte experimental

1. Método ELISPOT para células T específicas de *Aspergillus* productoras de INF-gamma

Para todos los experimentos ELISPOT de acuerdo con la presente invención, se usaron placas de microtitulación de 96 pocillos distribuidas por Mabtech (Nacka Strand, Suecia). La parte inferior de los pocillos de la placa, compuesta de nitrocelulosa, se recubre con un anticuerpo monoclonal específico para IFN- γ . Las placas se retiraron del envase y se lavaron 4 veces con PBS 1X (200 μ l/pocillo). Las placas se fijaron con R10 (200 μ l/pocillo) y se incubaron a temperatura ambiente durante $\geq$ 30 minutos. Los medios de fijación se retiraron y se dispensaron 100.000-200.000 células de medio R10 en los pocillos individuales (volumen final de 100-150 μ l/pocillo) y después se estimularon con

conidios inactivados por calor (1×10^5 conidios/ml) o con extracto de proteína (6-10 $\mu\text{g/ml}$) durante una incubación a 37°C en presencia de CO_2 (5%) durante aproximadamente 20 horas.

Los controles positivos consistían en las mismas células incubadas con fitohemaglutinina (PHA) (25 $\mu\text{g/ml}$) o con un grupo de 23 péptidos virales, restringidos para el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, procedentes de citomegalovirus, del virus de Epstein-Barr y del virus de la gripe (conjunto de Péptidos CEF, Mabtech); el control negativo consistía en las células individuales, sin ninguna estimulación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Después de la incubación, la placa se vacía y se somete a 5 lavados sucesivos con PBS 1x y Tween 20 al 0,5%. Los complejos de citosina-anticuerpo se colorean por medio de reacción enzimática y la adición de un sustrato cromogénico: en todos los pocillos individuales, se distribuyen 50 μl de anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, distribuido por Mabtech, diluido 1:200 en PBS 1X, y después de 90 minutos de incubación a temperatura ambiente se añade el sustrato (BCIP/NTB-plus), también distribuido por Mabtech. La reacción con el sustrato se detiene después de 10 minutos lavando la placa con agua corriente. La membrana de nitrocelulosa se seca en contacto con aire durante al menos 4 h. Cada mancha individual que aparece en el fondo del pocillo corresponde a la secreción de citocinas de una sola célula (célula formadora de manchas: SFC). Las manchas se cuentan automáticamente por medio de un instrumento de análisis de imágenes (AID ELISPOT Reader System, Amplimedical) dirigido por un software capaz de proporcionar una evaluación fácil y rápida de las manchas basándose en su tamaño e intensidad.

2. Método ELISPOT para células T específicas de *Aspergillus* productoras de IL-10

Para todos los experimentos ELISPOT, se usaron placas de microtitulación de 96 pocillos (Multiscreen HTS IP Sterile Plate) distribuidas por Millipore (Bedford, MA, Estados Unidos). En este caso, las placas no se recubren previamente, pero requieren recubrimiento con el anticuerpo monoclonal anti-IL-10. Se procede la siguiente manera: las placas se retiran del envase y la membrana se sumerge con Etanol al 70% (15 $\mu\text{l/pocillo}$) durante un minuto a temperatura ambiente. Las placas después se lavan 5 veces con agua destilada (200 $\mu\text{l/pocillo}$). El anticuerpo anti-IL-10 (9D7), distribuido por Mabtech, usado para el recubrimiento, se diluye a 15 $\mu\text{g/ml}$ en PBS 1X estéril a pH 7,4 y se añade en cantidades de 100 μl por pocillo a la placa que se incuba durante una noche a $+4-8^\circ\text{C}$.

Después de la incubación, la placa se somete a lavados sucesivos con PBS 1X (200 $\mu\text{l/pocillo}$). Los pocillos se fijan con un medio que contiene el mismo FBS al 10% usado para la suspensión de las células (200 $\mu\text{l/pocillo}$) y se incuba a temperatura ambiente durante ≥ 30 minutos. Los medios de fijación se retiran y 50.000-100.000 células en R10 se dispensan en los pocillos individuales (volumen final de 100-150 $\mu\text{l/pocillo}$) y después se estimulan con conidios inactivados por calor (1×10^5 conidios/ml) o con extracto de proteína (6-10 $\mu\text{g/ml}$) durante la incubación a 37°C en presencia de CO_2 (5%) durante aproximadamente 20 horas. Los controles positivos están compuestos por las mismas células incubadas con fitohemaglutinina (PHA) (25 $\mu\text{g/ml}$) o con anti-CD3 (Mabtech); el control negativo consistía en las células individuales, sin ninguna estimulación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Después de la incubación, la placa se vacía y se somete a 5 lavados sucesivos con PBS 1x. El anticuerpo secundario (12G8-biotina) se diluye a 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS-FCS al 0,5%, se añade en una cantidad de 100 $\mu\text{l/pocillo}$ y se incuba durante 2 h a temperatura ambiente. Se continúa con 5 lavados sucesivos con PBS 1x. El complejo de Estreptavidina-fosfatasa alcalina (1:1000) se diluye en PBS-FCS al 0,5%, se añade en una cantidad de 100 $\mu\text{l/pocillo}$ y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Se continúa con 5 lavados sucesivos con PBS 1x. La solución que contiene el sustrato (BCIP/NBT) se añade en una cantidad de 100 $\mu\text{l/pocillo}$ y se deja reaccionar hasta que aparecen las manchas. El desarrollo de color se bloquea con un lavado abundante en agua corriente. La membrana basal de la placa se retira y también se lava la base de la placa. La membrana de nitrocelulosa se seca en contacto con el aire durante al menos 4 h. Las manchas después se cuentan automáticamente por medio de un instrumento de análisis de imágenes (AID ELISPOT Reader System, Amplimedical) dirigido por un software capaz de proporcionar una evaluación rápida y fácil de las manchas basándose en su tamaño e intensidad.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación del antígeno a partir de conidios de *Aspergillus fumigatus*

Después de tres días de cultivo de *Aspergillus fumigatus* en medio de agar sabouraud, los conidios se recogen por medio del lavado de la capa superficial del cultivo con 30 ml de agua esterilizada.

El líquido de lavado se filtra a través de una gasa esterilizada y posteriormente se somete a centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante se elimina y se procede con la congelación del sedimento de conidios durante 12 horas en

nitrógeno líquido. El sedimento de conidios después se descongela y se suspende en 1-2 ml de agua esterilizada y se hierve en un baño de agua durante 1,5 horas. Después se procede con una centrifugación adicional a 12000 rpm durante 10 minutos y el sedimento de conidios se resuspende en 500 µl de PBS 1x.

- 5 Finalmente, los conidios obtenidos pueden usarse directamente en el experimento ELISPOT de acuerdo con la presente invención a una concentración de 100.000 conidios/ml. Como alternativa, los conidios se congelan a -20°C hasta el momento de uso, de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 2

- 10 Preparación del antígeno a partir de hifas de *Aspergillus fumigatus*

A partir del cultivo de *Aspergillus fumigatus* en medio de agar sabouraud, se procede con el raspado de varias placas de cultivo y la suspensión del producto raspado en 30 ml de agua esterilizada.

- 15 La suspensión obtenida se agita con vórtice, se filtra a través de una gasa esterilizada y se centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos.

- 20 El sobrenadante después se elimina y se procede a congelar el sedimento de micete durante 12 horas en nitrógeno líquido.

El sedimento de micete después se descongela y se procede con la homogenización en un mortero con un volumen igual de hongos/perlas en un tampón Tris-HCl 50 mM a un pH de aproximadamente 7,5.

- 25 El homogeneizado obtenido se centrifuga a 14000 rpm durante 20 minutos y se evalúa el contenido de proteínas.

Las hifas obtenidas finalmente pueden usarse directamente en el experimento ELISPOT de acuerdo con la presente invención a una concentración de 6-10 µg/ml. Como alternativa, las hifas se congelan a 20°C hasta el momento de uso, de acuerdo con la presente invención.

- 30 Estudio clínico

- 35 Para evaluar si el recuento de células T específicas de *Aspergillus* que producen IFN-γ-TH1 e IL-10 (IL-10-TH2) mediante un ensayo inmunospot enzimático (ELISPOT) podría mejorar el diagnóstico clínico de AI, se realizaron ensayos clínicos en una serie de 10 pacientes hematológicos con neutropenia e infiltraciones pulmonares, tres con infección AI demostrada y dos donantes sanos.

- 40 Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de cada paciente o sujeto sano mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Linaris Bettingen an Main, Alemania) y después se extendieron en una placa de fluoruro de polivinilideno de 96 pocillos con anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma o IL-10 (Mabtech, Nacka Strand, Suecia). Las células se ensayaron con conidios inactivados con calor preparados a partir de *Aspergillus fumigatus* aislado de un paciente o con un extracto celular soluble en agua de *Aspergillus fumigatus* y con PHA, 1×10^5 células/pocillo y $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en las placas recubiertas mencionadas anteriormente para el ensayo de IFN gamma e IL-10 respectivamente, durante dieciséis horas.

- 45 Todas las condiciones de ensayo se realizaron por triplicado y los resultados se consideraron positivos si el número de células formadoras de manchas (SFC)/106 células en pocillos con antígeno de *Aspergillus* estimulados era dos veces el de los pocillos de control (células en pocillos de antígeno de *Aspergillus* no estimulados) y había al menos 20 manchas.

- 50 El primer paciente es una mujer de 59 años, que padecía leucemia mieloide aguda (AML), que durante la fase neutropénica del tratamiento de inducción quimioterapéutica (Fig. 1B), tuvo fiebre y una lesión nodular, rodeada por un halo de atenuación con densidad de vidrio esmerilado (ground glass) en el pulmón izquierdo, revelado por tomografía computarizada de alta resolución (HRCT). El cultivo y los exámenes moleculares de la sangre, orina, heces y fluido de lavado broncoalveolar (BALf) dieron repetidamente resultados negativos con respecto a la presencia de bacterias, hongos o virus. La investigación de galactomanano (GM) fue negativa tanto en suero como en BALf. La paciente continuó con fiebre a pesar de la terapia con antibióticos y antimicótica con vancomicina, meropenem y anfotericina liposomal (L-amB), a la dosificación de 3 mg/kg/día. Una segunda HRCT del tórax reveló un aumento de la lesión nodular y persistencia del halo de atenuación con densidad de vidrio esmerilado. El GM en sangre siguió siendo negativo (Fig. 1B). La dosis de L-amB se aumentó a 5 mg/kg/día. Varios días después, la paciente consiguió apirexia, coincidiendo con la recuperación medular completa. Después de una semana, la HRCT mostró una ligera reducción tanto del tamaño de la lesión pulmonar como del halo circundante (Fig. 1B). La paciente se sometió a una resección del foco bronconeumónico mediante videotoracoscopia (VATS). Los exámenes histológico e inmunohistoquímico de la sección operada revelaron una Aspergillosis Invasiva (AI) pulmonar.

- 65 La segunda paciente es una mujer de 67 años que desarrolló fiebre e infiltraciones pulmonares bilaterales durante la

fase neutropénica después de un ciclo de inducción quimioterapéutico para AML. El cultivo y exámenes moleculares de la sangre, orina, heces y fluido de lavado broncoalveolar (BALf) fueron repetidamente negativos con respecto a la presencia de bacterias, hongos o virus. Con una terapia de antibióticos empírica de segunda línea, se obtuvo la resolución de todos los focos pulmonares excepto uno, que mostró ampliación en la HRCT. El cultivo y los exámenes moleculares de la sangre, orina, heces y fluido del lavado broncoalveolar (BALf) permanecieron negativos con respecto a la presencia de organismos patógenos responsables de la infección. La investigación de galactomanano (GM) fue negativa en sangre, mientras que mostró un resultado positivo en BALf. La terapia con L-amB se realizó a la dosificación de 3 mg/kg/día. Después de la curación medular completa, la paciente tuvo una remisión completa de la hemopatía. Después de un mes de tratamiento antifúngico, el infiltrado pulmonar se redujo ligeramente, presentando un pequeño signo de excavación. Antes de realizar la quimioterapia de consolidación, la paciente se sometió a una resección quirúrgica pulmonar del lóbulo derecho. Los exámenes histológicos e inmunohistoquímicos revelaron una AI pulmonar. Varios días después de la intervención quirúrgica, la paciente tuvo AML recurrente y murió por la progresión de la enfermedad.

El tercer paciente era un hombre joven de 24 años afectado por leucemia linfática aguda (ALL), que desarrolló fiebre y una región nodular perihiliar del pulmón izquierdo durante la fase neutropénica de la quimioterapia de inducción. El cultivo y exámenes moleculares de la sangre, orina, heces y fluido de lavado broncoalveolar (BALf) fueron repetidamente negativos con respecto a la presencia de bacterias, hongos o virus. La investigación de galactomanano (GM) fue negativa tanto en suero como en BALf. El examen citológico de BALf mostró la presencia de hifas fúngicas septadas. La terapia antifúngica con voriconazol se realizó a dosis intravenosas de 200 mg dos veces al día. Después de dos semanas de tratamiento, el tamaño de la lesión nodular permaneció sin cambios y había aparecido una pequeña área de excavación. Como el paciente había tenido un episodio de hemoptisis, se decidió realizar una resección quirúrgica del segmento superior del lóbulo pulmonar inferior izquierdo. Los exámenes inmunohistoquímicos e histológicos de la sección operada revelaron AI pulmonar. El paciente consiguió la remisión completa de la hemopatía y completó dos ciclos de quimioterapia de consolidación.

En el paciente 1, el método ELISPOT de acuerdo con la presente invención se realizó en muestras de sangre periférica recogidas entre la primera y segunda HRCT, al mismo tiempo que la tercera HRCT, y después de una y tres semanas desde la ejecución de la VATS. El ELISPOT fue positivo para una respuesta de células T específicas de *Aspergillus*, polarizada de tipo TH2, y productora de interleucina 10 (IL-10) en cada determinación, y mostró un resultado positivo creciente para una respuesta de células T específicas de *Aspergillus*, polarizada de tipo TH1 y productora de interferón gamma (IFN- γ) (Fig. 1A).

En el paciente 2, el método ELISPOT de acuerdo con la presente invención se realizó al mismo tiempo que la primera HRCT, varios días antes de la operación quirúrgica y en el momento de la recaída de ALM. El ELISPOT fue positivo para una respuesta de células T específicas de *Aspergillus*, polarizada de tipo TH2 y productora de IL-10, en la primera y segunda determinaciones, y mostró resultados positivos para una respuesta de células T específicas de *Aspergillus*, polarizada de tipo TH1 y productora de IFN- γ en la segunda determinación. La tercera determinación fue negativa para cualquier tipo de respuesta de células T específica (Fig. 1C).

En el paciente 3, el método ELISPOT se realizó al mismo tiempo y quince días después de la operación quirúrgica, antes del primer y segundo ciclos de quimioterapia de consolidación. El ELISPOT fue positivo para una respuesta de células T específicas de *Aspergillus*, polarizada de tipo TH2 y productora de IL-10, en la primera y segunda determinaciones, y mostró resultados positivos para una respuesta específica de *Aspergillus*, polarizada de tipo TH1 y productora de IFN- γ en cada determinación (Fig. 1D).

Resultados clínicos:

El método de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, ha proporcionado muestras de la Aspergillosis Invasiva en los tres pacientes. En particular, los resultados positivos del ELISPOT de acuerdo con la presente invención son la única prueba de la infección en el paciente 1, en el que el diagnóstico se consiguió de otra manera sólo mediante una operación quirúrgica, dando resultados negativos todos los demás métodos. El método ELISPOT de acuerdo con la presente invención entonces representa una mejora eficaz del poder de diagnóstico del GM sobre BAL y de la citología BAL en los pacientes 2 y 3, respectivamente, permitiendo un diagnóstico seguro y no sólo supuesto.

La Fig. E representa los resultados del ELISPOT en pacientes afectados de neumonía con etiología no fúngica, como controles negativos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el diagnóstico de aspergillosis invasiva que comprende realizar un ensayo ELISPOT inmunoenzimático *in vitro* en el que el fluido biológico extraído del paciente se pone en contacto con un antígeno de *Aspergillus fumigatus*, caracterizado porque dicho método comprende verificar la presencia de células T productoras de IFN- γ y células T productoras de IL-10 y/o la relación entre células T productoras de IFN- γ y células T productoras de IL-10.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho antígeno es un antígeno extractivo de *Aspergillus fumigatus*.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho antígeno se obtiene a partir de conidios de *Aspergillus fumigatus*.
- 15 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho antígeno se obtiene a partir de hifas de *Aspergillus fumigatus*.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho antígeno se obtiene mediante los siguientes pasos:
 - 20 - incubación de los conidios durante 3 días,
 - recogida de los conidios por medio de lavado del cultivo fúngico con agua esterilizada,
 - filtración y posterior centrifugación del líquido de lavado,
 - eliminación del sobrenadante,
 - congelación y posterior descongelación del sedimento de conidios,
 - 25 - suspensión en agua esterilizada,
 - ebullición y posterior centrifugación, y
 - posible congelación.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho antígeno se obtiene mediante los siguientes pasos:
 - 30 - recogida de hifas de placas de cultivo mediante raspado y posterior suspensión en agua esterilizada,
 - filtración y posterior centrifugación,
 - eliminación del sobrenadante,
 - congelación y posterior descongelación del sedimento del micete,
 - 35 - homogeneización del micete en presencia de un volumen de perlas de material inerte igual al volumen del micete,
 - centrifugación
 - posible congelación.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichas perlas están hechas de vidrio.
- 40 8. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho fluido biológico se selecciona entre sangre, fluido de lavado broncoalveolar o fluido pleural.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho fluido biológico se selecciona entre todas las células mononucleares de la sangre, del fluido del lavado broncoalveolar, del fluido pleural, o linfocitos T de la sangre, del fluido del lavado broncoalveolar o del fluido pleural.
- 45 10. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el valor umbral para IFN- γ o IL-10 está en el intervalo de 15-25 SFC.
- 50 11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho valor umbral es 20 SFC.

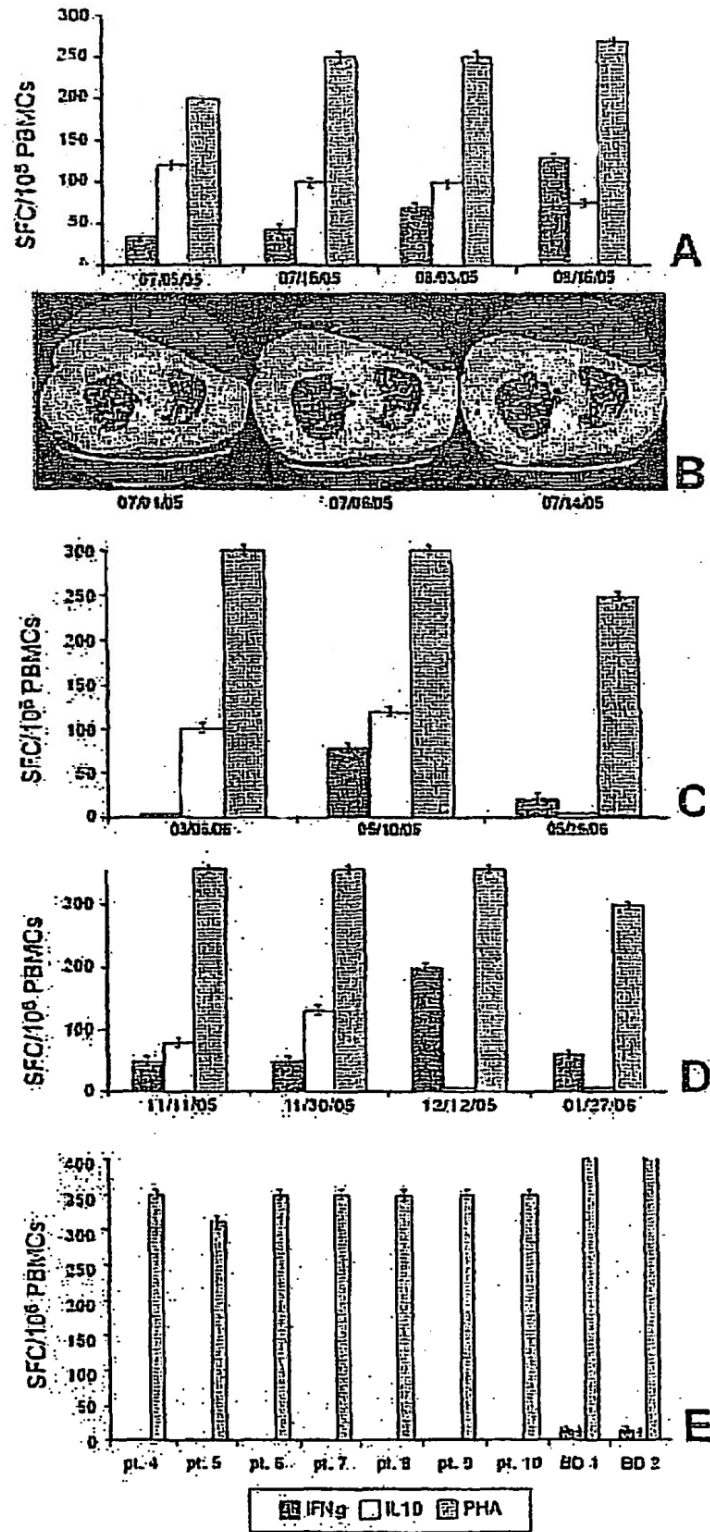


Fig. 1