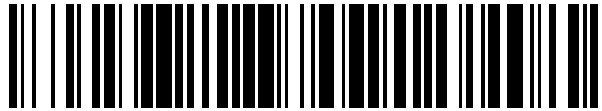


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 811**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09768924 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2288920**

54 Título: **Procedimiento para la determinación de infecciones por Trichinella**

30 Prioridad:

27.06.2008 DE 102008030129

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

11.03.2013

73 Titular/es:

**PRIONICS AG (100.0%)
Wagistrasse 27a
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**RÄBER, ALEX;
HAUPT, TINA y
BUHOLZER, PATRIK**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 811 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

Procedimiento para la determinación de infecciones por *Trichinella*

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la determinación de infecciones por *Trichinella* según el preámbulo de la reivindicación 1.

10 *Trichinella* spp. comprende un grupo de nematodos que aparecen en todo el mundo. Las especies que predominan en Europa son *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella pseudospiralis* y *Trichinella nativa*. Las infecciones por *Trichinella* pueden aparecer en diferentes especies, incluido el hombre, cerdos, ratas, osos, caballos y aves, por mencionar sólo algunos ejemplos.

15 En el caso de *Trichinella* se trata de nematodos parásitos que recorren un ciclo vital definido. Las larvas son ingeridas por el consumo de carne cruda o insuficientemente cocida. Después del consumo, son liberadas por los jugos gástricos desde donde acceden al tracto intestinal. Aquí se desarrollan para formar nematodos adultos. Después del apareamiento, las hembras paren hasta 1500 nuevas larvas que, a través de la linfa y del torrente sanguíneo, acceden al tejido muscular estriado, en particular el diafragma, lengua, ojos y músculos masticatorios. Las larvas se desarrollan y forman complejos de larvas que calcifican en el transcurso del tiempo.

20 Las infecciones por *Trichinella* representan un gran problema en la cría de animales. Debe excluirse con seguridad el hecho de que los seres humanos, después de consumir carne cruda o no suficientemente cocida de animales enfermos, enfermen de triquinelosis. La triquinelosis humana es una enfermedad grave que provoca considerables dolencias y que, en casos extremos, conduce a la muerte.

25 Por lo tanto, con el fin de la seguridad en los alimentos, p. ej. todas las canales de cerdo deben ser testadas como parte de un examen post-mortem. Por norma general, las canales continúan siendo elaboradas inmediatamente después de la matanza. Lo problemático en ensayos habituales es que el descuartizado en instalaciones de descuartizado previstas a continuación del matadero ya ha sido concluido en una determinada parte antes de que se disponga de los resultados de los ensayos de *Trichinella*. Esto representa un problema logístico considerable. En caso de duda, en el supuesto de resultados positivos, las piezas descuartizadas del cerdo deben ser seleccionadas del circuito de tratamiento y destruidas.

35 Actualmente están permitidos procedimientos en los que la *Trichinella* es detectada de forma directa. Un método antiguo en Europa, admitido ya sólo durante un período de transición, es la denominada triquinoscopia, en la que tejido es comprimido entre dos placas de vidrio y luego es examinado al microscopio. Este procedimiento es ciertamente poco sensible y, además, laborioso y costoso. Además, especies de *Trichinella* que no se encapsulan tales como, p. ej., *Trichinella pseudospiralis*, no son descubiertas o sólo lo son con mucha dificultad.

40 Otro método admitido es el denominado ensayo de digestión que es más sensible que la detección directa previamente descrita. En el caso de este ensayo, el tejido muscular que rodea a la larva es digerido artificialmente con proteasas y ácido clorhídrico y, después de diferentes etapas de sedimentación, quedan al descubierto las larvas. A continuación, se puede determinar al microscopio el número de larvas. El límite de detección se encuentra en 3 a 5 larvas por gramo de tejido.

45 Esencialmente más rápidos y con una sensibilidad claramente superior se encuentran procedimientos serológicos conformes al género expuesto en los que la mayoría de las veces se detectan de un modo indirecto anticuerpos contra *Trichinella* spp. Procedimientos serológicos de este tipo pueden llevarse a cabo, por ejemplo, en el suero sanguíneo o en el jugo de carne. Procedimientos habituales tienen un límite de detección de 0,01 larvas por gramo de tejido muscular.

50 En el caso de procedimientos serológicos conformes al género expuesto, p. ej. muestras de suero procedentes del organismo a examinar, son mezcladas con antígenos de *Trichinella*, p. ej. el antígeno excretor/secretor (E/S). Eventuales anticuerpos contenidos en el suero en virtud de la presencia de una infección por *Trichinella* se unen al antígeno. Los anticuerpos ligados son detectados, por su parte, por ejemplo con anticuerpos anti-IgG de cerdo marcados. Procedimientos serológicos habituales trabajan, p. ej., con antígenos inmovilizados y detectan anticuerpos IgG eventualmente ligados. Antígenos especiales adicionales para procedimientos serológicos se dan a conocer, p. ej., en el documento WO 2007/090960.

60 Reiterova K. et al., (*Infection* 35(2); 2007; págs. 89-93) da a conocer la determinación de una infección por *Trichinella*, que comprende la incubación de suero del paciente con antígeno E/S acoplado a placas ELISA, y determinación de IgG e IgM por medio de anti-anticuerpos correspondientes (resumen).

5 A pesar de que procesos serológicos conformes al género expuesto son muy sensibles, por el momento no están todavía admitidos para la inspección de carne o en programas de seguridad de alimentos. Ciertamente los procesos serológicos son más rápidos y más sensibles que los ensayos directos tales como, p. ej., la digestión artificial, pero las actuales Normas de la UE no permiten, sin embargo, ningún ensayo individual de canales con procesos serológicos, dado que los procesos serológicos conocidos pueden proporcionar resultados falsos negativos, en particular en la fase temprana de la infección. Una postura similar la adopta la Comisión Internacional de Triquinelosis (CIT). También en este caso, se critica el que la ventana diagnóstica para métodos serológicos no es suficiente y no se pasan por alto eventuales animales positivos con los métodos de los que se dispone en virtud de la señal demasiado baja en la fase de infección temprana. Sin embargo, dado que también en esta fase las larvas se encuentran ya en la musculatura y, con ello, pueden ser infecciosas, también los animales deben ser identificados con seguridad en la fase de infección temprana.

15 Misión de la presente invención es habilitar un proceso serológico seguro para el diagnóstico de infecciones por *Trichinella* con el que se puedan detectar tanto infecciones tempranas como también infecciones avanzadas por *Trichinella*.

20 El problema se resuelve con un procedimiento según la reivindicación 1. Ejecuciones ventajosas están indicadas en las reivindicaciones subordinadas.

25 El procedimiento de acuerdo con la invención funciona esencialmente tal como se ha indicado antes. Una muestra del hombre o animal a examinar, p. ej. suero o jugo de carne, se incuba con antígenos preferiblemente inmovilizados. Anticuerpos contenidos eventualmente en la muestra se fijan a los antígenos. Los complejos anticuerpo-antígeno se detectan entonces con anticuerpos marcados. En tal caso, puede tratarse, en particular, de procesos ELISA. Sin embargo, también son imaginables otros procedimientos con otras marcaciones que puedan ser detectadas, p. ej., ópticamente.

30 Tal como ya se ha indicado antes, los ensayos habituales de *Trichinella* detectan los complejos de anticuerpo-antígeno con anticuerpos contra anticuerpos IgG, dado que estos son los anticuerpos persistentes que habitualmente se forman de manera creciente en el transcurso de la infección.

Conforme a la invención, se prevé entonces que, además, se examine simultáneamente si se formaron anticuerpos IgM. Esto puede tener lugar de una manera sencilla mediante la adición de anticuerpos contra anticuerpos IgM.

35 De acuerdo con la invención, se prevé, por lo tanto, examinar la muestra en cuanto a la presencia de anticuerpos IgM e IgG en combinación. En la fase temprana de la infección se forman predominantemente anticuerpos IgM, mientras que el contenido en anticuerpos IgG comienza sólo a partir del 15º día después de la infección. El contenido en anticuerpos IgM empieza a disminuir de nuevo aproximadamente en este instante.

40 La disminución en el contenido en anticuerpos IgM a observar relativamente pronto después de la infección, es también un motivo esencial de por qué, p. ej. procesos ELISA con los que se determinan anticuerpos IgM, no sean considerados adecuados para el diagnóstico de infecciones por *Trichinella*. Para ello se remite de manera representativa a una tesis doctoral llevada a cabo en el "Instituto para Parasitología" en Varsovia, Polonia, con el título "The usefulness of ELISA test for early serological detection of *Trichinella* spp. infection in pigs", el cual se presentó en el marco de un debate en 2006. En la tesis doctoral se confrontaron métodos en los que se detectaron, por una parte, anticuerpos IgG y, por otra parte, anticuerpos IgM. En el marco de esta publicación se comprobó que procesos ELISA, con los que se detectan anticuerpos IgG, son adecuados básicamente para la detección de infecciones por *Trichinella*. Por el contrario, los anticuerpos IgM no se catalogaron como marcadores adecuados de la reacción humoral de animales infectados. Un motivo esencial era que, al menos según la opinión vertida en la publicación, no se puede detectar, en particular *Trichinella spiralis*. Otro motivo es, naturalmente, que la concentración de IgM disminuye de nuevo de forma relativamente precoz y la ventana diagnóstica sólo puede cubrir, por lo tanto, infecciones tempranas.

55 En algunas investigaciones, que posteriormente se explicarán con ayuda de las Figuras 1 y 2, los solicitantes han encontrado que anticuerpos de la clase IgM también se manifiestan en el caso de infecciones por *Trichinella spiralis* y que se pueden detectar, p. ej., con ELISA. En este sentido, parece ser que anticuerpos IgM parecen ser, en contra de la opinión vertida, básicamente marcadores adecuados para la determinación de infecciones por *Trichinella* tempranas.

60 A partir de la infección con *Trichinella*, en el organismo se presenta una respuesta inmune que se puede detectar con el procedimiento de acuerdo con la invención pocos días más tarde. Tal como se muestra en la Fig. 1 ó 2,

primeramente se detectan los anticuerpos IgM, en el transcurso posterior de la infección, anticuerpos IgM e IgG, y luego, de manera creciente, sólo anticuerpos IgG.

5 El procedimiento de acuerdo con la invención reconoce, con ello, una infección en una fase esencialmente más temprana que los métodos hasta ahora conocidos y reduce, por lo tanto, la ventana diagnóstica (véase también la Fig. 3 discutida más abajo).

10 Con el ensayo concebido por los solicitantes, en el que, por primera vez, se detectan al mismo tiempo las dos respuestas de anticuerpos, se pueden superar, de manera sorprendente, las desventajas esenciales de procesos serológicos conocidos.

15 En el marco de la divulgación es posible detectar, en general, la presencia de una respuesta de anticuerpos a una infección por *Trichinella* en una muestra, sin asociar los anticuerpos a una clase. Si, además de ello, se desea también disponer de información de si se trata de una fase de infección temprana o más bien una fase de infección posterior, entonces también es posible proveer a los anti-anticuerpos empleados en el procedimiento de acuerdo con la invención de diferentes marcaciones, en el sentido de si están pensados para la detección de anticuerpos IgG o IgM.

20 Como ya se ha expuesto anteriormente, en procesos serológicos habituales y también en procesos serológicos de acuerdo con la invención, se añaden a una muestra antígenos de *Trichinella*. En el caso de los antígenos se puede tratar, en particular, del antígeno E/S. Sin embargo, también son imaginables otros polipéptidos de acción inmunógena, individualmente o en combinación, tal como se describen, p. ej., en la solicitud de patente internacional PCT/EP2007/005774 o en el documento WO 2007/090960.

25 Naturalmente, también pueden emplearse varios antígenos diferentes, en particular antígenos que se manifiestan en diferentes fases de la infección. De este modo, se ofrece a los anticuerpos eventualmente contenidos, bajo determinadas circunstancias, posibilidades de unión mejores, lo cual conduce asimismo a una mejora de los resultados.

30 Con el fin de facilitar la detección de complejos de antígeno-anticuerpo eventualmente formados se prevé, preferiblemente, emplear los antígenos en forma inmovilizada. Es imaginable, p. ej., revestir las paredes de placas de microtitulación con los antígenos. Otra posibilidad es fijar los antígenos a perlas. Básicamente, son adecuadas todas las inmovilizaciones con las que los anticuerpos y anticuerpos eventualmente ligados a ellos puedan separarse de manera sencilla del resto de la muestra.

35 Además, está previsto, de acuerdo con la invención, que los anti-anticuerpos presenten una marcación detectable con procedimientos habituales. En tal caso se puede tratar, p. ej., de una marcación adecuada para una detección ELISA. Sin embargo, también son imaginables otras marcaciones detectables, p. ej. ópticamente, tales como p. ej. marcadores de fluorescencia.

40 En el caso de las muestras de tejido investigadas puede tratarse, en particular, de sangre, suero, plasma o jugo de carne.

45 Junto a un procedimiento, la divulgación se refiere también a una composición diagnóstica que puede ser empleada en el procedimiento.

50 Una composición de este tipo contiene un antígeno de *Trichinella* adecuado, en particular inmovilizado, así como anticuerpos anti-IgG y anti-IgM provistos de una marcación que permite una detección. Preferiblemente, los antígenos de *Trichinella* y los anti-anticuerpos son confeccionados por separado, de modo que primero se puede crear un contacto entre los antígenos y la muestra de tejido y luego, después de un tiempo de incubación suficiente, puede tener lugar la adición de los anti-anticuerpos.

55 Preferiblemente, el antígeno de *Trichinella* está previsto en forma inmovilizada. Es imaginable, p. ej., un acoplamiento a perlas o un revestimiento de las paredes de pocillos de microtitulación con el antígeno, por nombrar sólo algunos ejemplos.

Esencialmente, la inmovilización del antígeno sirve para posibilitar una separación más sencilla de eventuales complejos de antígeno-anticuerpo de la muestra. Esta separación facilita la detección específica de los complejos.

60 Junto a ensayos heterogéneos son imaginables, naturalmente, también ensayos homogéneos, es decir, métodos en los que el antígeno se presenta de manera no inmovilizada. Un método preferido sería, p. ej., un ensayo de

polarización por fluorescencia. La realización de un método de este tipo es habitual para el experto en la materia. Por lo tanto, en este caso no se ha de entrar en detalles.

5 Tal como ya se ha indicado con respecto al procedimiento, la composición contiene en calidad de antígeno preferiblemente el denominado antígeno E/S de *Trichinella* o bien segmentos inmunógenos de este antígeno. Naturalmente, también es imaginable el empleo de otros polipéptidos de *Trichinella* con una acción antigénica. Básicamente, pueden emplearse todos los péptidos o polipéptidos que presenten una serie de aminoácidos que formen un epítipo continuo o discontinuo que sea reconocido por sueros que procedan de cerdos infestados con *Trichinella*.

10 Naturalmente, también se imaginable combinar varios antígenos diferentes en la composición. Los antígenos pueden presentarse en forma de mezcla. También es imaginable, sin embargo, preverlos acoplados entre sí, por ejemplo en forma de proteína de fusión.

15 Las marcaciones en los anti-anticuerpos pueden, finalmente, configurarse de modo que posibiliten una detección óptica de manera sencilla. Preferiblemente, se emplean, sin embargo, procesos ELISA. Naturalmente, por lo tanto, los anti-anticuerpos pueden ser acoplados con correspondientes enzimas que posibiliten la detección deseada según ELISA.

20 Las ejecuciones descritas en relación con la composición se pueden trasladar, en la medida en que todavía no se haya allí mencionado, naturalmente también al marco del procedimiento.

En lo que sigue se ha de explicar en detalle la invención con ayuda de varias figuras.

En este caso muestran:

25 La **Fig. 1** y **Fig. 2**, en representación esquemática, los resultados de procesos ELISA en la determinación de la respuesta inmune de cerdos infestados por vía oral de manera artificial con 20.000 larvas de *T. spiralis* y

30 la **Fig. 3 (A)-(C)**, una representación esquemática de las ventanas diagnósticas cubiertas con diferentes procedimientos en la identificación de infecciones por *Trichinella*.

35 Las Figuras 1 y 2 muestran en cada caso los resultados de 3 procesos ELISA. Se representa en cada caso el transcurso de la IgG (■), de la IgM (◆), así como de la respuesta de IgG e IgM combinada (▲) a una infección por *Trichinella* en diferentes instantes.

40 Los cerdos fueron infestados por vía oral artificialmente con 20.000 larvas de *T. spiralis*, y muestras de suero de los cerdos infestados fueron examinadas en diferentes instantes. La Fig. 1 y Fig. 2 muestran los resultados de investigaciones que fueron llevadas a cabo bajo condiciones iguales en muestras que fueron obtenidas de diferentes cabañas porcinas.

45 Las muestras fueron tomadas los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 siguientes a la infección (d.p.i. = días después de la infección). Se demostró que la detección combinada de la respuesta de IgM e IgG ya podía ser detectada al 7º día siguiente a la infección y que se mantenía luego a lo largo de toda la vida del animal.

Se representan, además, las reacciones de IgM que se han de medir de una manera relativamente temprana después de la infección y la respuesta de IgG que puede ser detectada a partir de aprox. el 15º día y que luego se puede detectar de manera relativamente constante a lo largo del resto de la vida del animal.

50 Las dos figuras 1 y 2 muestran transcurros similares de las reacciones arriba mencionadas.

La Fig. 3 (A)-(C) muestra esquemáticamente las ventanas diagnósticas cubiertas con diferentes procedimientos [(A) = ensayo de digestión; (B) = ELISA E/S habitual y (C) = ELISA de acuerdo con la invención] en la identificación de infecciones por *Trichinella*.

55 La Figura 3 (A) muestra que el instante más temprano en el que se puede detectar una infección por *Trichinella* con el ensayo de digestión artificial es el 17º día después de la infección.

60 La Figura 3 (B) muestra las condiciones en la identificación de infecciones por *Trichinella* en cerdos utilizando un proceso ELISA E/S habitual. Aquí se demuestra que con un procedimiento serológico habitual, una detección de una respuesta inmune es posible, como muy temprano, el 21º después de la infección. En este instante, las larvas pueden ya ser infecciosas.

5 La Figura 3 (C) muestra entonces las condiciones para el procedimiento de acuerdo con la invención en la identificación de cerdos infestados por *Trichinella*. El instante más temprano en el que se puede detectar una respuesta de anticuerpos en muestras de cerdos infectados por *Trichinella* es el 7º día después de la infección. Esto es claramente antes que en los dos procedimientos representados en (A) y en (B). Al 7º día, las larvas siguen siendo todavía no infecciosas. Por lo tanto, se ha de partir del hecho de que el procedimiento de acuerdo con la invención posibilita una determinación lo suficientemente segura de infecciones por *Trichinella*.

10 La comparación de los diversos métodos de detección en (A), (B) y (C) está representada con líneas discontinuas. **b** designa la ventana diagnóstica para ELISA E/S habitualmente utilizado (B), **a** la ventana diagnóstica para el ensayo de digestión artificial (A), mientras que **c** muestra la ventana diagnóstica para el proceso ELISA de acuerdo con la invención (C). También a partir de esta representación resulta claro que con el procedimiento de acuerdo con la invención, los cerdos infectados pueden ser detectados en un instante significativamente más temprano. La ventana diagnóstica se vuelve con ello claramente más estrecha, una detección de una infección por *Trichinella* es incluso posible en una fase más temprana que con el ensayo de digestión artificial y hace a un procedimiento de diagnóstico de este tipo adecuado para el ensayo individual de la carne en el matadero.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la determinación de infecciones por Trichinella en un animal o el ser humano, que comprende la incubación con antígenos de Trichinella de una muestra de tejido tomada del animal o del ser humano, el tratamiento de la muestra de tejido, la adición de anti-anticuerpos a la muestra de tejido y la verificación de si ha tenido lugar una unión de los anti-anticuerpos a eventuales complejos antígeno-anticuerpos contenidos en la muestra de tejido, caracterizado porque como anti-anticuerpos se añaden al mismo tiempo anticuerpos anti-IgG y anticuerpos anti-IgM.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como antígeno se emplea antígeno de E/S de Trichinella.
- 15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque los antígenos empleados se presentan en forma inmovilizada.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se emplean anti-anticuerpos marcados.
- 20 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se provee a anticuerpos anti-IgG de una marcación distinta a la de los anticuerpos anti-IgM.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la muestra de tejido es suero, plasma o jugo de carne.

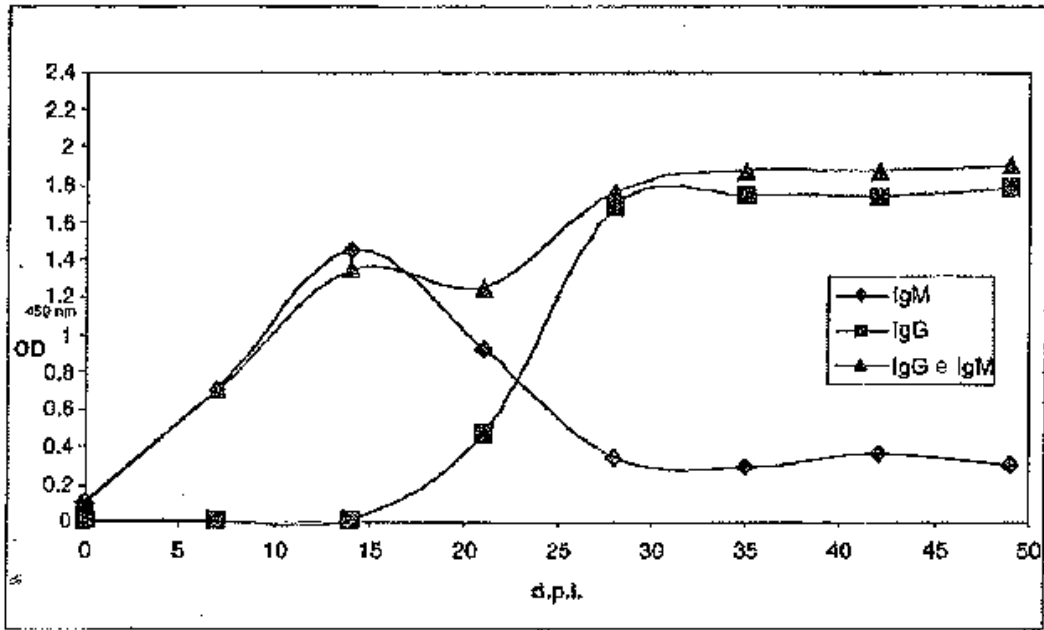


Fig. 1

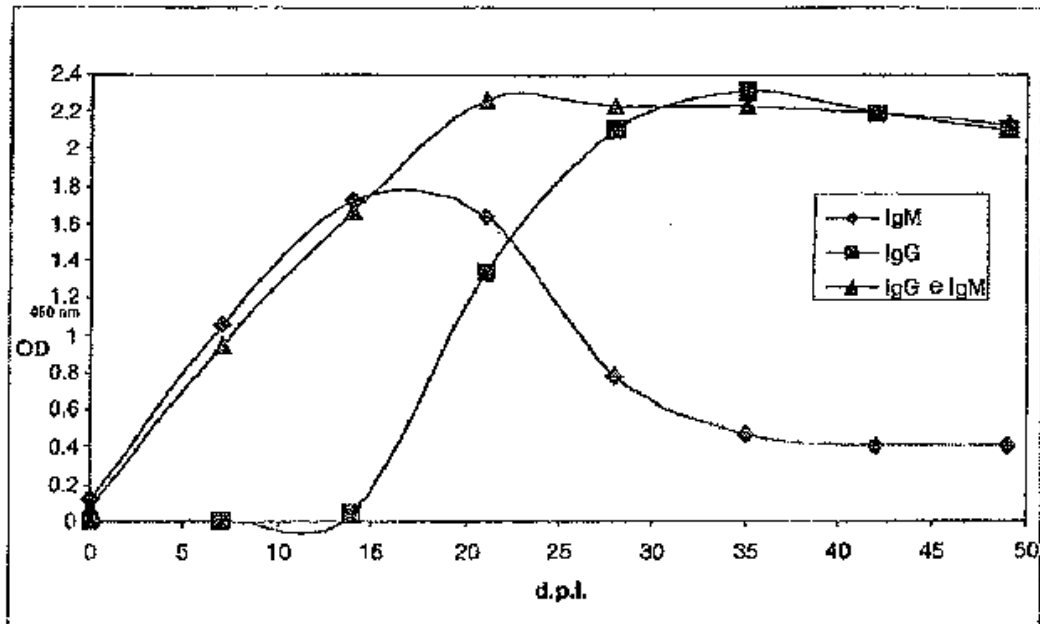


Fig. 2

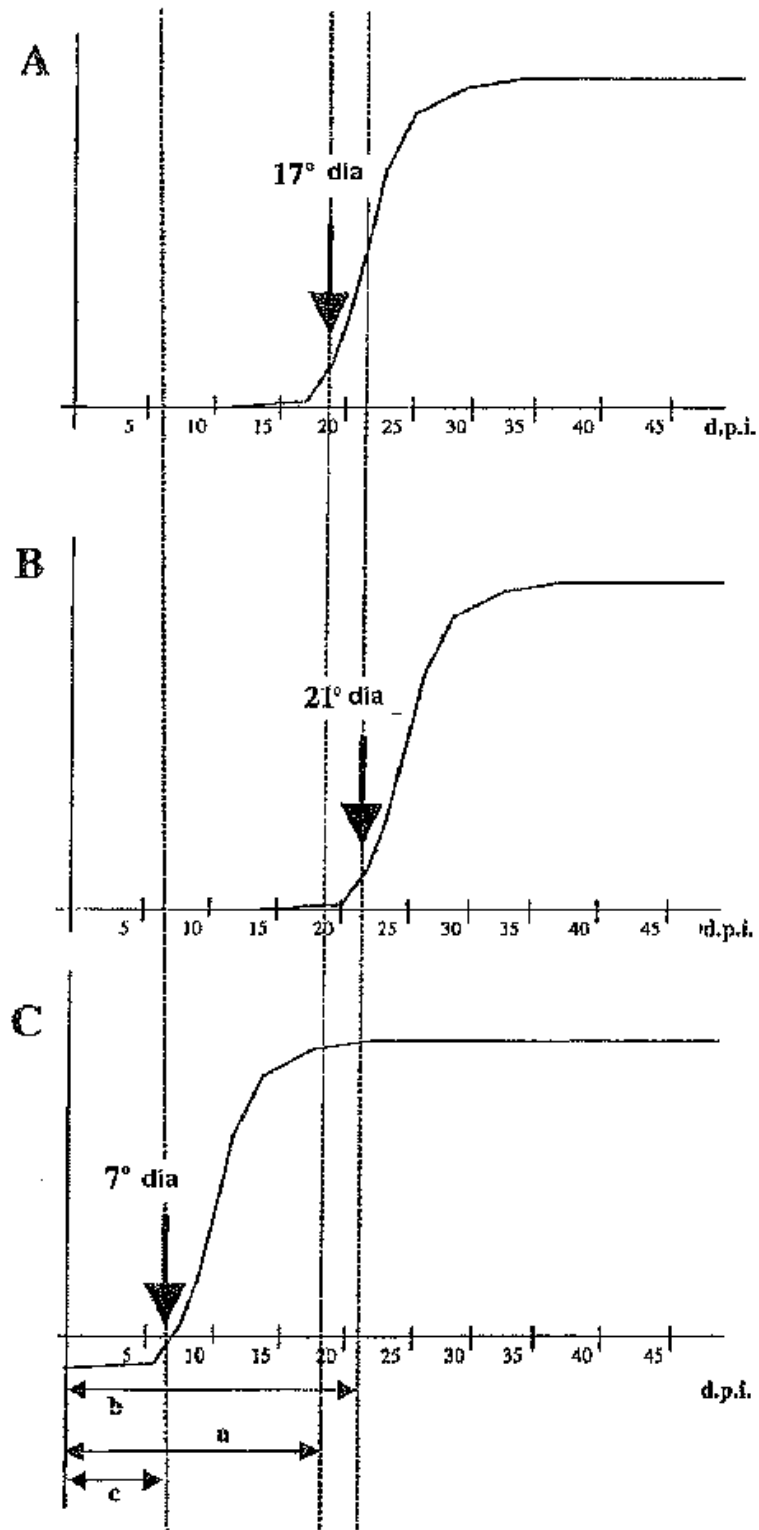


Fig. 3