

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 540**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2010** **E 10075079 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013** **EP 2362222**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la detección simultánea de anticuerpos unidos a sustratos sintéticos y celulares y/o tisulares**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2013

73 Titular/es:

MEDIPAN GMBH (100.0%)
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Dahlewitz/Berlin, DE

72 Inventor/es:

KNÜTTER, ILKA DR.;
RADAU, BORIS DR. y
ROGGENBUCK, DIRK DR.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 425 540 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 y dispositivo para la detección simultánea de anticuerpos unidos a sustratos sintéticos y celulares y/o tisulares

5 La invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo para el diagnóstico de enfermedades que detecta simultáneamente anticuerpos unidos a sustratos celulares y/o tisulares y anticuerpos unidos a sustratos sintéticos, tales como micropartículas o perlas revestidas con antígenos específicos, proporcionando de esta manera un procedimiento en "una etapa" para la detección simultánea y caracterización de anticuerpos asociados con enfermedades tanto a baja especificidad (celular y/o tisular) como a alta especificidad (antigénica).

Antecedentes de la invención

10 En diagnósticos rutinarios se ha establecido la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) empleando diferentes sustratos celulares y tisulares como fuentes de antígeno múltiples. Los ensayos de inmunofluorescencia basados en células, tales como la detección de anticuerpos antinucleares (AAN) utilizando células HEP-2, se usan ampliamente en diagnósticos clínicos y en investigación como referencia en el sector (Tan EM, Adv. Immunology 1982; 33:167-240, Costes SV, y col., Radiat Res. 2006; 165(5):505-15, Sack U, y col., Ann N Y Acad Sci 2009; 1173:166-73, Conrad K, y col., Ann N Y Acad Sci 2009; 1173:180-185). Además se conoce la técnica anterior que desvela ensayos de inmunofluorescencia basados en células utilizando células HEP-2 u otras líneas celulares para detectar anticuerpos antinucleares o anti-MTOC (documentos WO 2009/062497, WO 97/06440), el documento WO 97/06440 desvela procedimientos para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, mediante un ensayo de este tipo, utilizando, en particular, la línea celular IT-1 de macrófagos.

15 La demanda creciente de lectura automática e interpretación de patrones de fluorescencia, que den como resultado una mejor normalización y rentabilidad, ha sido posible gracias a un sofisticado programa informático de reconocimiento de patrones y a lectores totalmente automáticos ya disponibles en la actualidad (Hou YN, y col., Radiat Res. 2009; 171 (3):360-7, Hiemann R, y col., Ann N Y Acad Sci 2007;1109:358-71, Böcker W, y col., Radiat Res. 2006;165(1):113-24. Hiemann R, y col., Autoimmun Rev. 2009; 9:17-22).

20 Sin embargo, avances realizados en el desarrollo de ensayos y la tecnología recombinante han preparado el camino para la detección de especificidades de autoanticuerpos contra dianas antigénicas individuales mejorando de esta manera el poder de diagnóstico de los ensayos con anticuerpos. La creciente diversidad de anticuerpos encontrados en diferentes trastornos, tales como enfermedades infecciosas y reumáticas, ha generado la necesidad de técnicas innovadoras, que superen los inconvenientes de la detección de anticuerpos únicos y que disminuyan el coste y el tiempo de presentación de resultados. Por consiguiente, recientemente se han desarrollado plataformas múltiples para atender la demanda de determinaciones simultáneas de diversas especificidades de anticuerpos en una muestra. Ensayos múltiples basados en citometría de flujo basada en perlas fluorescentes y los sistemas de micromatrices han demostrado ser herramientas poderosas que dan soporte a análisis de más alto rendimiento y a ensayos más exhaustivos de las muestras de pacientes (Avaniss-Aghajani E, y col., Clin Vaccine Immunol. 2007; 14:505-9, Lal G, y col., J Immunol Methods 2005; 296:135-47).

25 Como ejemplo, los autoanticuerpos (AAC) específicos de enfermedades, son un fenómeno serológico de afecciones reumáticas sistémicas y trastornos hepáticos autoinmunes. En particular, la detección de AAN por IFI fue una de las primeras técnicas disponibles en laboratorios habituales para el diagnóstico serológico de enfermedades reumáticas sistémicas. A pesar del desarrollo del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y de las tecnologías de formación de complejos múltiples para la detección de AAC específicos de enfermedades, la detección de AAN por ensayos de IFI sigue siendo el procedimiento de referencia en la estrategia actual de diagnóstico multifase. Se han propuesto diversos sustratos para los ensayos de AAN por IFI, sin embargo, el procedimiento más establecido es la exploración de AAC no específicos de órganos en células HEP-2.

30 En general, después de la evaluación de AAN se realiza la detección de AAC específico para, por ejemplo, antígenos nucleares extraíbles (ANE) y antígenos citoplasmáticos por inmunoensayos que emplean antígenos naturales purificados o recombinantes. Esta estrategia en dos fases presenta los siguientes beneficios: (i) detección altamente sensible de los AAC más frecuentes, no específicos de órganos, clínicamente relevantes, (ii) combinación óptima con otras técnicas de ensayo por la diferenciación aguas abajo de reactividades de los AAC basándose en el patrón de IFI detectado y en la sospecha del diagnóstico (por ejemplo, SS-A/Ro y SS-B/La), (iii) evaluación de AAC clínicamente relevantes sin la necesidad de más ensayos (por ejemplo, AAC anti-centrómero) y (iv) evaluación de AAC solo detectable por IFI en el caso de dianas autoantigénicas desconocidas o ensayos no disponibles comercialmente.

35 Otro ejemplo es la detección de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN) para el diagnóstico diferencial de vasculitis sistémica (Bosch X, y col., Lancet 2006; 368:404-18). Debido a la aparición de ACAN en estos trastornos autoinmunes sistémicos la expresión vasculitis asociada a ACAN (VSAA) se ha acuñado para estas entidades clínicas. Los ACAN se descubrieron por IFI, que aún es el procedimiento recomendado para detectar estas reactividades de anticuerpos. Generalmente los ACAN muestran dos patrones de tinción diferentes de granulocitos

fijos en IFI; un patrón citoplasmático moteado (C-ACAN) y un patrón perinuclear (P-ACAN). El C-ACAN se encuentra frecuentemente en pacientes con granulomatosis de Wegener (GW), se dirige contra la proteinasa 3 (PR3), mientras que el P-ACAN, producido principalmente en la poliangiitis microscópica (PAM), se dirige contra la mieloperoxidasa (MPO) (Van der Woude FJ, y col., Lancet 1985; 1:425-9).

5 Se ha propuesto que las estimaciones de las concentraciones de anticuerpos, son útiles en el diagnóstico y el tratamiento de estas entidades clínicas. Los valores de anticuerpo normalmente se asocian con la gravedad de la enfermedad (Cohen Tervaert JW, y col., Arch Intern Med 1989; 149: 2461-5). Sin embargo, ha habido otros antígenos diana para ACAN descritos en IFI que pueden encontrarse en pacientes sin VSAA (Savige J, y col., Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. 19: 263-76, Savige J, y col., Am J Clin Path 2003; 120:312-8). En consecuencia, de acuerdo con las directrices consenso establecidas recientemente, además de la IFI, para la detección de ACAN se recomienda una técnica diferente, tal como ELISA.

10 Sin embargo, las técnicas empleadas para determinar diversos anticuerpos mediante la estrategia multifase mencionada anteriormente implican una pluralidad de ensayos de constituyentes marcados individualmente. Con respecto a la rentabilidad de los diagnósticos serológicos hay una clara demanda de combinar, por un lado, la detección de anticuerpos contra dianas antigénicas celulares y tisulares y, por otro lado, contra sus polipéptidos caracterizados y purificados, en un solo procedimiento con un marcador.

15 La caracterización actual de proteínas mediante tecnología de micromatrices no proporciona por sí sola ninguna solución satisfactoria. Al aumentar el número de dianas antigénicas a ensayar en una sola micromatriz, la demanda de equipos de fabricación asociados, la miniaturización y los materiales y el manejo especializados, harán que la producción de dichas micromatrices sea cada vez más compleja y costosa. Otras técnicas, incluyendo el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), los ensayos cromogénicos, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS), y la cromatografía de capa fina (TLC), presentan la desventaja de estar limitadas en cuanto al número de analitos en forma antigénica que puedan evaluarse simultáneamente. Además requieren mucho tiempo y equipos costosos. Por el contrario, empleando un sustrato de células HEP-2 para la detección de AAN se proporcionan más de 1.200 dianas antigénicas para la identificación de anticuerpos.

Sumario de la Invención

20 En vista del problema técnico subyacente de la técnica anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades, que reduce un diagnóstico multi-etapa a un procedimiento de una etapa. Este problema se resuelve por las características de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la presente invención las proporcionan las reivindicaciones dependientes.

25 El objetivo de la invención es, por tanto, proporcionar un procedimiento y un dispositivo para el diagnóstico de enfermedades que detecte anticuerpos unidos a sustratos celulares y/o tisulares y detecte simultáneamente anticuerpos unidos a sustratos sintéticos, tales como micropartículas revestidas con antígenos específicos naturales purificados y/o recombinantes, proporcionando así un procedimiento de "una etapa" para la detección simultánea de anticuerpos asociados con enfermedades tanto a baja especificidad (específica celular y/o tisular) como a alta especificidad (específica antigénica).

30 La presente invención se refiere adicionalmente a un dispositivo y a un kit para realizar el procedimiento de la presente invención. El procedimiento también es adecuado para un procedimiento de selección, en el que la reactividad de varios sueros de pacientes puede ensayarse contra cualquier número de antígenos específicos determinado.

35 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de diagnóstico de enfermedades que comprende la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y/o tisulares y uno o más sustratos sintéticos, caracterizado por proporcionar una mezcla de sustratos celulares y/o tisulares y sintéticos, incubar dicha mezcla de sustratos con fluido corporal del paciente que contiene el anticuerpo a detectar, para permitir de esta manera la unión del anticuerpo a detectar con dicha mezcla de sustratos, detectar sustratos celulares y/o sintéticos y anticuerpos unidos a dichos sustratos utilizando la microscopía de fluorescencia, y evaluar los datos de formación de imágenes por inmunofluorescencia utilizando un sistema automático de interpretación-reconocimiento de patrones.

40 El sustrato celular o tisular representa un sustrato para la unión del antígeno, en el cual pueden aplicarse combinaciones de distintos tipos de tejido o células. En una realización preferida del procedimiento mencionado anteriormente, el sustrato celular o tisular puede ser de células HEP-2, de granulocitos humanos y/o de tejido pancreático.

45 En una realización adicional preferida, el sustrato sintético que se aplica es una micropartícula o perla revestida con antígeno natural purificado y/o antígeno recombinante. Se pretende que el sustrato sintético actúe como un vehículo para un antígeno específico, o una mezcla de antígenos específicos, purificados y/o recombinantes. En la técnica se conocen vehículos micropartículas o perlas de diversas sustancias y materiales y son adecuados para el procedimiento de la presente invención, por ejemplo, partículas o las perlas compuestas de polímeros naturales o

artificiales, sefarosa, celulosa, cristal u óxidos metálicos.

5 Se pretende que el antígeno que reviste el sustrato sintético se una a anticuerpos asociados con enfermedades. La identificación de la unión de anticuerpos a antígenos específicos permite de esta manera un diagnóstico de la enfermedad con "alta especificidad", además de una detección a "baja especificidad" de anticuerpos que se unen a sustratos celulares y/o tisulares.

10 Se pretende que los sustratos de la presente invención se identifiquen por una o más características o parámetros distintivos cuando se detecten por microscopía de fluorescencia. Para identificar sustratos celulares, tisulares o sintéticos pueden utilizarse características ópticas, de fluorescencia y/o físicas de los diversos sustratos. Por ejemplo, los diversos sustratos pueden identificarse por su tamaño, forma, color fluorescente u otros parámetros físicos durante un análisis microscópico. Los diversos parámetros también pueden combinarse para los diversos sustratos, de manera que representen un código de identificación de sustrato, antígeno y/o anticuerpo.

En una realización preferida de la presente invención se utilizó microscopía fluorescente multicolor para identificar dichos sustratos y/o anticuerpos unidos, mediante la cual los sustratos y/o anticuerpos unidos mostraban diferentes colores fluorescentes.

15 En otra realización preferida de la presente invención el sustrato celular se marca con DAPI, el sustrato sintético se marca con FITC y/o el anticuerpo unido se detecta mediante un anticuerpo específico contra anti-inmunoglobulina humana marcado con Cy5.

20 El procedimiento de la presente invención se refiere especialmente a enfermedades o trastornos en los que la detección de anticuerpos proporciona un diagnóstico eficaz, tales como enfermedades infecciosas y trastornos autoinmunes, preferentemente afecciones reumáticas sistémicas, trastornos autoinmunes hepáticos, diabetes de tipo-1, enfermedad de Lyme o virus del herpes simple.

25 La invención engloba una realización más en la que los anticuerpos a detectar son anticuerpos antinucleares (AAN) o anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN). Dichos anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos pueden caracterizarse porque muestran una tinción perinuclear (p-ACAN) o una tinción citoplasmática moteada (c-ACAN) de los granulocitos humanos.

En una realización más de la presente invención los anticuerpos a detectar se dirigen contra la Proteína 3 (PR3) o la mieloperoxidasa (MPO).

Un aspecto que se pretende en la invención es que el fluido corporal que contiene los anticuerpos a detectar sea sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o saliva.

30 La invención también incluye un procedimiento en el que un programa informático, especialmente diseñado, controla el sistema de interpretación, consistiendo dicho programa informático en módulos de control de dispositivos y autoenfoco, análisis de formación de imágenes y/o algoritmos de reconocimiento de patrones.

35 La presente invención también incluye un procedimiento, como se ha expuesto anteriormente, caracterizado porque para evaluar los datos de formación de imágenes de inmunofluorescencia se utiliza un sistema de interpretación según la siguiente jerarquía: i) señal de tinción positiva, ii) localización de la tinción (clasificación por patrones de tinción en células/tejidos o micropartículas), y iii) determinación de patrones celulares/tisulares (perinuclear, citoplasmático para granulocitos; nuclear, citoplasmático, cromatínico de células mitóticas para las células HEp-2). Esta jerarquía facilita un análisis rápido y preciso de las imágenes microscópicas recogidas, y por tanto permite un diagnóstico basándose en parámetros múltiples en los datos de inmunofluorescencia.

40 En una realización preferida, la clasificación de los patrones de tinción en células/tejidos o micropartículas y la determinación de patrones celulares/tisulares se consigue mediante una combinación de características de estructura y textura de la formación de imagen por inmunofluorescencia definiendo una serie de reglas para cada patrón.

45 La presente invención también incluye un kit para realizar el procedimiento de la presente invención para la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o más sustratos sintéticos, que comprende, portaobjetos con sustrato celular y/o tisular fijado mezclado con el sustrato sintético revestido con antígeno, donde i) el sustrato celular y/o tisular es preferentemente de células HEp-2 o de granulocitos humanos, y ii) los sustratos sintéticos se diferencian entre sí según sus características ópticas, fluorescentes, y/o físicas. El kit también contiene un conjugado que comprende un anticuerpo específico contra inmunoglobulina conjugado con un marcador fluorescente, preferentemente FITC o Cy5. Opcionalmente el kit también contiene tampón de lavado, cubreobjetos, medio de revestimiento, sustrato sintético sin revestimiento con antígeno, con o sin marcador fluorescente, y/o marcadores fluorescentes adicionales para sustratos sintéticos.

50

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la presente invención permite realizar el diagnóstico de enfermedades para las que normalmente se requieren diagnósticos multi-etapa. Las etapas de diagnóstico múltiples para la evaluación de anticuerpos que se unen a especificidades en aumento se combinan en este procedimiento para proporcionar un diagnóstico más eficaz, más rápido y preciso en un solo análisis de diagnóstico.

Este procedimiento se refiere especialmente a enfermedades o trastornos en los que la detección de anticuerpos proporciona un diagnóstico eficaz, tales como enfermedades infecciosas y trastornos autoinmunes. El procedimiento permite detectar no solo la presencia y patrón de unión de anticuerpos en células o tejidos, sino que también puede proporcionar información más específica sobre los antígenos individuales contra los que se dirigen los anticuerpos. Esto facilita el diagnóstico de trastornos específicos en un procedimiento de una etapa.

El procedimiento de la presente invención está particularmente adaptado para el diagnóstico de trastornos inflamatorios reumáticos sistémicos, tales como la vasculitis sistémica autoinmune. Dichos trastornos asociados con anticuerpos que se dirigen contra granulocitos (ACAN), tales como poliangitis microscópica (PAM), asociada con anticuerpos contra la mieloperoxidasa (MPO), y granulomatosis de Wegener (GW), asociada con anticuerpos contra la Proteína 3 (PR3), pueden diagnosticarse utilizando el procedimiento de la presente invención. El lupus eritematoso sistémico puede diagnosticarse, por ejemplo, cuando se asocia con anticuerpos dirigidos contra ADN de *Crithidia* y bicatenario. La polimiositis también puede diagnosticarse utilizando la presente invención, por ejemplo, cuando se asocia con anticuerpos dirigidos contra células HEp-2 o ARNt sintetasas.

Con la presente invención también pueden diagnosticarse trastornos hepáticos autoinmunes, tales como hepatitis autoinmune, por ejemplo, cuando se asocian con anticuerpos dirigidos contra células HEp-2. También pueden diagnosticarse trastornos asociados con anticuerpos contra actina fibrilar, hepatocitos o el receptor de asialoglicoproteína.

La diabetes tipo 1 también puede diagnosticarse utilizando la presente invención, por ejemplo, cuando se asocia con anticuerpos dirigidos contra células de los islotes pancreáticos, la glutamato descarboxilasa o la tirosina fosfatasa IA-2.

Una clase más de trastornos que puede diagnosticarse con el procedimiento de la presente invención se refiere a enfermedades infecciosas. Dichas enfermedades incluyen la Borreliosis o enfermedad de Lyme, en la que la enfermedad se asocia con anticuerpos dirigidos contra *Borrelia* o proteínas de *Borrelia* tales como la p21, p41, p100, OSPC u OSPA.

El virus del herpes simple es otra enfermedad infecciosa que puede diagnosticarse utilizando la presente invención, por ejemplo cuando se asocia con anticuerpos dirigidos contra el virus del herpes simple en células HEp-2 o el polipéptido del herpes simple.

El uso de soportes pequeños revestidos de antígeno, tales como las micropartículas codificadas por características ópticas o físicas de las mismas, o por adhesión con moléculas de información, junto con sustratos celulares y/o tisulares en un entorno de ensayo, proporciona sorprendentemente una base adecuada para la evaluación simultánea de múltiples actividades de anticuerpo descritas anteriormente en la estrategia multi-fase.

El procedimiento indicador óptimo para dicha técnica de detección es la fluorescencia multicolor, que puede emplearse fácilmente para codificar partículas y como un marcador para evaluar de manera simultánea múltiples interacciones antígeno-anticuerpo específicas. Un microscopio con un programa informático de reconocimiento de patrones, totalmente automático, lee las señales de fluorescencia que codifican partículas revestidas con diversos antígenos específicos, además de las señales de fluorescencia producidas por la detección de anticuerpos unidos a dianas sobre sustratos de partículas, celulares y/o tisulares.

El programa informático de reconocimiento de patrones permite la determinación simultánea de sustratos celulares y/o tisulares y sintéticos. Una serie de reglas definida para cada patrón (para patrones de sustratos celulares/tisulares y sintéticos) permite al programa informático identificar a qué sustrato específico corresponde cada señal fluorescente. Esto sucede gracias a las características ópticas, fluorescentes, y/o físicas exclusivas de los diferentes sustratos. Estas características actúan como un código para que el programa informático reconozca a qué sustrato se han unido los anticuerpos (y por tanto a qué antígeno específico). La determinación automática de patrones específicos celulares (tales como perinuclear y citoplasmático para granulocitos; nuclear, citoplasmático, citoplasmático moteado, cromatínico de células mitóticas para células HEp-2) proporciona información adicional que conduce al diagnóstico de la enfermedad, como se ha explicado anteriormente para la PAM y la GW.

El uso del reconocimiento sofisticado de patrones anula la necesidad de que el personal tenga que estar altamente formado y de que tenga que entender las diversas configuraciones de sistemas y los patrones de fluorescencia que son específicos de anticuerpos particulares. Dichos requisitos normalmente requieren costes elevados en la formación del personal. En términos de referencias de calidad y especificaciones de validación, a menudo es necesario realizar repeticiones experimentales, lo que requiere la supervisión de científicos o de cualquier otro personal altamente cualificado. Se necesita una reproducibilidad coherente y una alta calidad particularmente en la

IFI basada en células. La interpretación de patrones por inmunofluorescencia se ve influenciada por el conocimiento y la cualificación individual del investigador. Por tanto, es común que exista una alta variabilidad intra- e interlaboratorial y representa un problema de diagnóstico importante, especialmente en laboratorios no especializados.

5 La lectura automática de patrones de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos contra dianas celulares y antigénicas purificadas por sistemas automáticos de interpretación y reconocimiento inteligente de patrones, proporciona una base fiable para diagnósticos serológicos rentables, particularmente para los laboratorios con un gran número de muestras. La oportunidad de aplicar análisis y gestión de datos electrónicos modernos puede aliviar significativamente la pesada carga de trabajo en dichos laboratorios.

10 Para realizar la presente invención, como se demuestra en los ejemplos, se utilizan los siguientes procedimientos que además pretenden describir la invención mediante ejemplos prácticos y no representar una descripción limitante de la misma.

Pacientes:

15 Se recogieron muestras de suero de 10 pacientes con GW positiva por C-ACAN en IFI y de 10 pacientes con otra VSAA positiva por MPO-ACAN y se conservaron a -20 °C. El diagnóstico de GW se basó en las definiciones consenso de Chapel Hill para la GW. Como controles de enfermedad en el estudio se inscribieron diez pacientes que cumplieran los criterios de diagnóstico para lupus eritematoso sistémico (LES). Como controles sanos se utilizaron sueros de 10 donantes de sangre. Todas las muestras se extrajeron en el momento de la autorización e inscripción de los pacientes.

20 Detección de ACAN por IFI convencional:

Los ACAN se detectaron procesando muestras de pacientes sobre granulocitos humanos fijados con etanol y formalina según las recomendaciones del fabricante (GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Alemania). En resumen, los granulocitos fijados se incubaron en una cámara con humedad a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos con 50 µl de suero diluido en serie, comenzando a una concentración de 1:10. Después del lavado, los
25 inmunocomplejos se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de oveja anti-IgG humana conjugados con fluoresceína durante 30 minutos a TA. Posteriormente, las muestras se lavaron, se fijaron y se analizaron manualmente por microscopía de fluorescencia.

Detección de anticuerpos contra MPO y PR3 por ELISA:

Los anticuerpos contra MPO y Proteinasa 3 en los sueros de los pacientes se detectaron utilizando ELISA de
30 diferentes generaciones empleando PR3 humana purificada y MPO como antígenos de fase sólida, respectivamente, según las recomendaciones de los fabricantes (GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Alemania; Aesku.Diagnostics GmbH, Wendelsheim, Alemania).

Detección simultánea de ACAN y anticuerpos contra MPO y PR3:

Se aislaron granulocitos humanos mediante un gradiente de densidad (MPRM, MP Biomedicals, Eschwege
35 Alemania y LSM 1077, PAA, Pasching Austria). Se recogió la banda rica en granulocitos. Tras la lisis de los eritrocitos, se lavaron los granulocitos con PBS complementado con EDTA 1 mM y FCS al 2 %. Los granulocitos separados se mezclaron con perlas revestidas con MPO o PR3 marcadas con FITC (PolyAN, Berlin, Alemania) y la suspensión resultante se diluyó a 1:50. Esta mezcla se inmovilizó en la superficie de portaobjetos para diagnóstico de 6 pocillos fabricados de vidrio. Los portaobjetos se fijaron con etanol al 70 % (5 min, 4 °C). Para la IFI, los
40 portaobjetos combinados con granulocitos/perlas se incubaron en una cámara de humedad a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos con 25 µl de suero diluido a 1:20. Tras el lavado, los inmunocomplejos unidos se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con Cy5 (Dianova, Hamburg, Alemania) durante 30 minutos a TA. Posteriormente, las muestras se lavaron, se fijaron y se analizaron por el sistema de reconocimiento automático de patrones de señales de fluorescencia (véase más adelante).

45 Reconocimiento automático de patrones de señales fluorescentes:

Los patrones fluorescentes de las muestras de suero para la detección múltiple simultánea de anticuerpos unidos a
antígenos celulares, y unidos a antígenos aplicados sobre micropartículas, se evaluaron automáticamente utilizando un microscopio invertido motorizado (Olympus IX81, Olympus Corp., Japón) con una fase de barrido motorizada (IM120, Märzhäuser, Alemania), diodos emisores de luz (LED) a 400 nm, 490 nm, 525 nm y 635 nm (precisExcite,
50 CoolLED, RU), y una cámara de escala de grises (PS4, Kappa, Alemania). El sistema de interpretación se controlaba por un programa informático especialmente diseñado, que consistía en módulos para control de dispositivos y autoenfoco, análisis de formación de imágenes, y algoritmos de reconocimiento de patrones. El nuevo autoenfoco se basaba en la caracterización de objetos por formación de imágenes de Haralick a través de la transición en una escala de grises utilizando, como colorante fluorescente para el reconocimiento y el enfoque de
55 los objetos, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Para eliminar artefactos, se realizó un análisis adicional de formación de imágenes cualitativo dividiendo la imagen en sub-objetos del mismo tamaño.

La segmentación de los objetos se realizó utilizando un algoritmo umbral basado en histograma seguido de transformación de Watershed. Los objetos segmentados se caracterizaron por descriptores regionales, topológicos y de textura/superficie. Se implementaron más de 1.400 criterios de descripción de objetos.

5 Los datos de formación de imágenes por fluorescencia se evaluaron según la siguiente jerarquía: i) señal de tinción positiva, ii) localización de la tinción (celular o micropartícula), y iii) determinación de los patrones de tinción celular: perinuclear o citoplasmático.

10 Las células se identificaron por tinción con DAPI y las micropartículas por tinción con FITC. La inmunofluorescencia específica de Cy5, para la unión específica de anticuerpos, se analizó en el tercer canal de fluorescencia. La clasificación se consiguió mediante la combinación de las características de estructura y textura por definición de reglas para cada objeto.

15 Para evaluar los datos de formación de imágenes se calculó un índice de reactividad (IR) combinando la intensidad absoluta de la imagen, el contraste y el número de niveles de escala de grises de todas las imágenes. Aunque el IR está influenciado por el tiempo de exposición, que depende de la señal de formación de imágenes más elevada después de la exclusión de los artefactos, se podían detectar incluso patrones con señales absolutas débiles. La determinación de los valores umbral para la diferenciación de señales positivas se realizó basándose en valores del IR de 200 donantes de sangre normales.

Descripción de las figuras

La invención se describe adicionalmente por las figuras. Estas no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Fig. 1: Análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos contra MPO

20 Fig. 2: Análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos contra PR3

Fig. 1: En la Figura 1 se muestran los resultados del análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos contra MPO. Una muestra de suero, que ya se había ensayado como positiva para pACAN, y otra muestra de suero, que ya se había ensayado como positiva para cACAN, se ensayaron en portaobjetos con granulocitos humanos junto con micropartículas revestidas con MPO. La localización de los granulocitos en el portaobjetos se detectó por tinción con DAPI mientras que las micropartículas revestidas con antígeno se evaluaron por tinción con FITC. El suero positivo a pACAN demostró una señal positiva con los granulocitos inmobilizados y con las micropartículas revestidas con MPO. La unión de los anticuerpos a la MPO localizada en los granulocitos e inmobilizada sobre las partículas (mostrado con flechas) se mostró por tinción específica con el conjugado Cy5. Por el contrario, el suero positivo a cACAN generó una reacción positiva solamente con los granulocitos.

30 Fig. 2: En la Figura 2 se muestran los resultados del análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos contra PR3. Una muestra de suero, que ya se había ensayado como positiva para pACAN, y una muestra de suero que ya se había ensayado como positiva para cACAN, se ensayaron en portaobjetos con granulocitos humanos junto con micropartículas revestidas con PR3. La localización de los granulocitos se detectó por tinción con DAPI mientras que las micropartículas revestidas con antígeno se evaluaron por tinción con FITC. El suero positivo a cACAN demostró una señal positiva con los granulocitos inmobilizados y con las micropartículas revestidas con PR3.

35 La unión de anticuerpos a la PR3 localizada en los granulocitos e inmobilizada sobre las partículas (mostrado con flechas) se mostró por tinción específica con el conjugado Cy5. Por el contrario el suero positivo a pACAN generó una reacción positiva solamente con los granulocitos.

Ejemplos

40 La invención también se describe mediante los siguientes ejemplos que no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Detección simultánea de ACAN y anticuerpos contra MPO

45 Para la detección simultánea de ACAN y anticuerpos contra MPO, se inmobilizaron granulocitos humanos en suspensión con perlas revestidas con MPO en los pocillos de los portaobjetos para diagnóstico de 6 pocillos fabricados de vidrio. Los núcleos de los granulocitos se detectaron mediante tinción con DAPI, mientras que las perlas revestidas se localizaron marcando con FITC. Para la IFI, los portaobjetos combinados con granulocitos/perlas se incubaron con suero diluido a 1:20. Después del lavado, los inmunocomplejos formados se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con Cy5.

50 Se analizaron los portaobjetos con granulocitos y perlas revestidas con MPO (Figura 1). En el panel superior, se muestran imágenes de tinción de un suero pACAN tomadas con los tres canales diferentes: para DAPI (a la izquierda), FITC (en el centro) y Cy5 (a la derecha). En el panel inferior, el portaobjetos combinado se tiñó con un suero cACAN. Solamente la imagen teñida con el suero pACAN mostraba también una tinción positiva para las partículas revestidas con MPO en el canal Cy5 específico. Por lo tanto, la tinción perinuclear de los granulocitos, que es típica de anticuerpos contra MPO, se confirmó por la tinción de las perlas revestidas con MPO.

Ejemplo 2: Detección simultánea de ACAN y anticuerpos contra PR3

5 Para la detección simultánea de ACAN y anticuerpos contra PR3, granulocitos humanos en suspensión con perlas revestidas con PR3 se inmovilizaron en los pocillos de portaobjetos para diagnóstico de 6 pocillos fabricados de vidrio. Los núcleos de los granulocitos se detectaron por tinción con DAPI, mientras que las perlas revestidas se localizaron marcando con FITC. Para la IFI, los portaobjetos combinados con granulocitos/perlas se incubaron con suero diluido a 1:20. Después del lavado, los inmunocomplejos formados se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con Cy5.

10 Los portaobjetos con granulocitos y perlas revestidas con PR3 (Figura 2) se analizaron. En el panel superior, se muestran imágenes de tinción de un suero pACAN tomadas con los tres canales diferentes: para DAPI (a la izquierda), FITC (en el centro) y Cy5 (a la derecha). En el panel inferior, el portaobjetos combinado se tiñó con un suero cACAN. La Figura 2 muestra las imágenes de tinción usando micropartículas revestidas con PR3, en vez de las partículas revestidas con MPO del ejemplo 1. A diferencia del ejemplo 1, el suero cACAN demostraba una reacción positiva con las perlas revestidas con PR3 en el panel inferior. Por tanto, la tinción citoplasmática de los granulocitos típica de los anticuerpos contra PR3 se confirmó por la tinción de las perlas revestidas con PR3.

15 **Ejemplo 3: Evaluación de sueros específicos de enfermedad y de control**

20 Con el fin de ensayar la especificidad de la detección de anticuerpos ACAN, anti-PR3 y anti-MPO mediante IFI en portaobjetos con granulocitos y micropartículas revestidas con antígeno, se evaluó el suero de 10 pacientes con GW anti-PR3 positivos, el suero de 10 pacientes con VSAA anti-MPO positivos, el suero de 10 pacientes con LES, y el suero de 10 donantes de sangre. El diagnóstico de GW se basaba en las definiciones consenso de Chapel Hill para la GW. En el estudio, se inscribieron diez pacientes que cumplían los criterios de diagnóstico de LES como controles de enfermedad. Los sueros de 10 donantes de sangre se utilizaron como controles sanos.

La reactividad de ACAN se determinó de acuerdo con el patrón de inmunofluorescencia de tinción positiva de granulocitos. La reactividad a las micropartículas revestidas con MPO o con PR3 se evaluó simultáneamente por detección de tinción positiva de micropartículas.

25 Casi todos los sueros GW que fueron positivos a cACAN por IFI, revelaron una reactividad positiva con las perlas revestidas con PR3 (90 %) y un patrón cACAN con granulocitos fijados (100 %) del portaobjetos combinado. Por el contrario, todos los sueros VSAA que fueron positivos para pACAN por IFI, demostraron una reactividad positiva con las perlas revestidas con MPO y un patrón pACAN con granulocitos fijados. Por supuesto, todos los pacientes control fueron negativos con los granulocitos fijados o las micropartículas revestidas de antígeno. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

30 Tabla 1: Detección simultánea de ACAN en granulocitos y anticuerpos contra MPO y PR3 en perlas revestidas con antígeno.

	Granulocitos		Micropartículas	
	cACAN	pACAN	Anti-PR3	Anti-MPO
Pacientes con GW anti PR3 positivos	10/10	0/10	9/10	0/10
Pacientes con VSAA anti-MPO positivos.	0/10	9/10	0/10	10/10
Pacientes con LES	0/10	0/10	0/10	0/10
Donantes de sangre	0/10	0/10	0/10	0/10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades que comprende la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y/o tisulares y a uno o más sustratos sintéticos, **caracterizado por:**
 - 5 a) el suministro de una mezcla de sustratos celulares y/o tisulares y sintéticos
 - b) la incubación de dicha mezcla de sustratos con el fluido corporal del paciente que contiene el anticuerpo a detectar, permitiendo de esta manera la unión del anticuerpo a detectar con dicha mezcla de sustratos.
 - c) la detección de sustratos celulares y/o sintéticos y de anticuerpos unidos a dichos sustratos utilizando microscopía de fluorescencia, y
 - 10 d) la evaluación de datos de imágenes de inmunofluorescencia utilizando un sistema automático de reconocimiento e interpretación de patrones.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el sustrato celular o tisular es de células HEp-2, de granulocitos humanos y/o de tejido pancreático.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el sustrato sintético es una micropartícula o una perla revestidas con antígeno natural purificado y/o antígeno recombinante.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el antígeno que reviste el sustrato sintético está unido a anticuerpos asociados con una enfermedad.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las características ópticas, fluorescentes y/o físicas de los diversos sustratos se utilizan para identificar dichos sustratos.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** para identificar dichos sustratos y/o autoanticuerpos unidos se utiliza la microscopía de fluorescencia multicolor, presentando los sustratos y/o los anticuerpos unidos diferentes colores fluorescentes.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el sustrato celular está marcado con DAPI, el sustrato sintético está marcado con FITC y/o el anticuerpo unido específicamente se detecta mediante un anticuerpo específico anti-inmunoglobulina humana marcado con Cy5.
- 25 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la enfermedad es un trastorno autoinmune o infeccioso, preferentemente una afección reumática sistémica, un trastorno autoinmune hepático, diabetes de Tipo-1, enfermedad de Lyme o virus del herpes simple.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** los anticuerpos a detectar son anticuerpos antinucleares (AAN) o anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN).
- 30 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** los anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos muestran una tinción perinuclear (p-ACAN) o una tinción citoplasmática moteada (c-ACAN) de granulocitos humanos.
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** los anticuerpos se dirigen contra la Proteinasa 3 (PR3) o la mieloperoxidasa (MPO).
- 35 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el fluido corporal es sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o saliva del paciente.
13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el sistema de interpretación está controlado por un programa informático especialmente diseñado, que consiste en módulos para control de dispositivos y autoenfoco, análisis de imágenes y/o algoritmos de reconocimiento de patrones.
- 40 14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** para evaluar los datos de imágenes por inmunofluorescencia se utiliza el sistema de interpretación de acuerdo con la siguiente jerarquía:
 - 45 i) señal de tinción positiva,
 - ii) localización de la tinción (clasificación de patrones de tinción en células/tejidos o micropartículas), y
 - iii) determinación de patrones celulares/tisulares (perinuclear, citoplasmático para granulocitos; nuclear, citoplasmático, cromatínico de células mitóticas para células HEp-2).
15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la clasificación de los patrones de tinción en células/tejidos o micropartículas y la determinación de patrones celulares/tisulares se consigue a través de una combinación de características de estructura y textura de la imagen de inmunofluorescencia definiendo una serie de reglas para cada patrón.
- 50

16. Un kit para realizar el procedimiento de las reivindicaciones 1-15 para la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y a uno o más sustratos sintéticos, que comprende

- a) Portaobjetos con sustrato celular y/o tisular fijado, mezclado con el sustrato sintético revestido con antígeno, mediante los cuales
- 5
- i. el sustrato celular y/o tisular es preferentemente de células HEp-2 o de granulocitos humanos, y
 - ii. los sustratos sintéticos se diferencian entre sí de acuerdo con sus características ópticas, fluorescentes y/o físicas, y
- 10
- b) Conjugado con anticuerpos específicos contra inmunoglobulina conjugados con un marcador fluorescente, preferentemente FITC o Cy5, y opcionalmente
 - c) tampón de lavado, cubreobjetos, medio de revestimiento, sustrato sintético no revestido con antígeno, con o sin marcador fluorescente, y/o marcadores fluorescentes adicionales para sustratos sintéticos.

Fig. 1

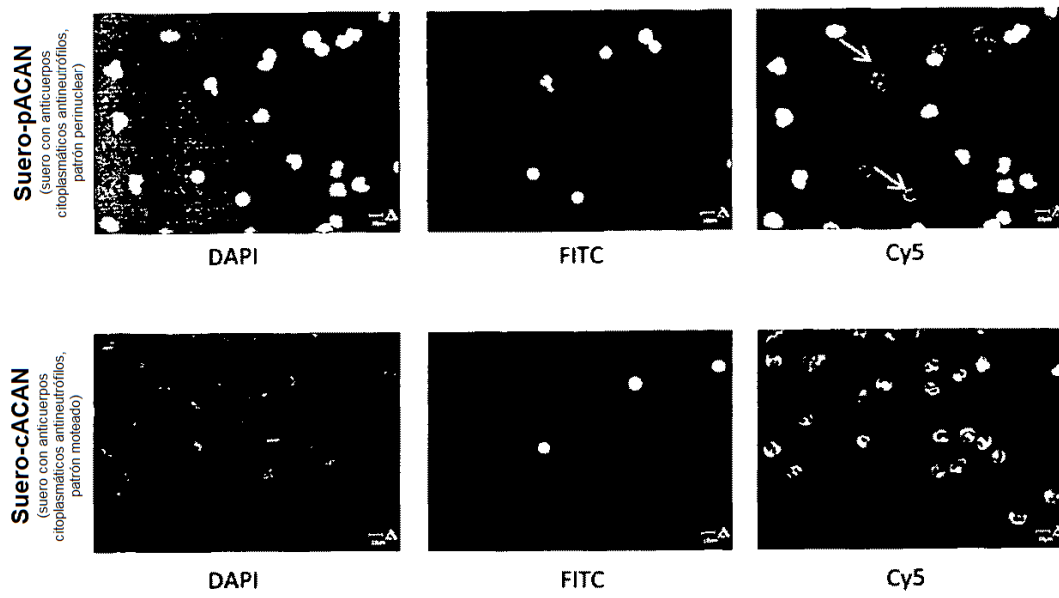


Fig. 2

