

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 980**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2007 E 07817923 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2087348**

54 Título: **Método de detección sistemática mediante adsorción de la muestra en papel de filtro**

30 Prioridad:

01.12.2006 DK 200601587

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

27.06.2014

73 Titular/es:

**STATENS SERUM INSTITUT (100.0%)
Orestads Boulevard 5
2300 Copenhagen S, DK**

72 Inventor/es:

**HOUEN, GUNNAR;
HOUGAARD, DAVID M.;
SKOGSTRAND, KRISTIN y
JØRGENSEN, CHARLOTTE SVÆRKE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 471 980 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

Método de detección sistemática mediante adsorción de la muestra en papel de filtro

5 Campo de la invención

La presente invención da a conocer un método para preparar una muestra de sangre u otro líquido biológico para su análisis mediante la mezcla de la muestra de sangre u otro líquido biológico con un compuesto de prueba y la siembra de sangre u otro líquido biológico en un papel de filtro para el análisis posterior del efecto de dicho compuesto de prueba sobre la muestra de sangre o líquido.

Antecedentes generales

15 La sangre es una mezcla compleja compuesta por plasma y células (1-3). El plasma se puede separar de las células por centrifugación y otras técnicas. Si el plasma se deja en reposo coagulará y el suero se puede separar del coágulo de sangre. La coagulación puede ser inhibida por adición de diversos anticoagulantes, por ejemplo EDTA, EGTA, heparina, citrato y otros. Las células sanguíneas incluyen células dendríticas, macrófagos, monocitos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales, glóbulos rojos y diversos citoblastos como los hemocitoblastos. Además están presentes en grandes cantidades plaquetas derivadas de megacariocitos. El plasma contiene miles de proteínas, en principio cualquier proteína del proteoma humano (4, 5). Algunas de las proteínas están involucradas en el transporte, la coagulación de la sangre o la inmunidad, mientras que otras actúan como moléculas de señalización entre las células de la sangre y las células de los tejidos. En particular, la actividad de las células del sistema inmunitario (células dendríticas, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales) está regulada por una red compleja de moléculas de señalización (por ejemplo interleucinas, quimiocinas, factores de crecimiento), antígenos tisulares y receptores (3, 6-9). Se pueden investigar y cuantificar la actividad y la especificidad de las células del sistema inmunitario por varios métodos y ensayos. Los linfocitos T, los linfocitos B y otras células se pueden cuantificar mediante clasificación celular activada por fluorescencia usando anticuerpos contra moléculas marcadoras de la superficie celular (10, 11). Los linfocitos T específicos se pueden medir mediante ensayos de citotoxicidad, ensayos de liberación de cromógeno y ensayos de liberación de citocinas (por ej. ELISPOT) (12-16) y usando diversos constructos proteicos péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (17, 18). La actividad de los linfocitos B se puede medir mediante la determinación de los niveles de anticuerpos específicos liberados por los linfocitos B (19, 20).

35 Un problema importante en la medición de las moléculas de señalización liberadas de las células sanguíneas es el del almacenamiento y transporte en relación con la cuantificación. Muchos componentes sanguíneos por ej. citocinas) son lábiles y de vida corta, lo que resulta en una degradación durante la incubación, el almacenamiento y el transporte. Por esta razón, los análisis comparativos y las pruebas diagnósticas se deben llevar a cabo inmediatamente después de la extracción de la sangre y la incubación en los laboratorios centrales. Idealmente, se deben analizar consecutivamente todas las muestras que se van a comparar usando un instrumento calibrado.

40 Esto no siempre es práctico, por ej. cuando se extraen muestras de sangre en áreas alejadas, cuando se hacen estudios en el tiempo in vitro e in vivo o cuando se comparan muestras de muchos individuos diferentes. Una solución a este problema es congelar las muestras para el transporte y el almacenamiento. Esto, no obstante, no garantiza la conservación de los componentes, requiere gran capacidad de congelación, transporte y almacenamiento, requiere descongelar cada vez que se realiza el análisis y es vulnerable con respecto a la falta de suministro de energía eléctrica. Por esta razón, existe la necesidad de métodos confiables de conservación de las muestras de sangre y biológicas, y existe la necesidad de pruebas diagnósticas que empleen una conservación de la muestra en combinación con la manipulación de la muestra que sea confiable.

50 El uso de papel de filtro para la siembra de gotas de sangre para el análisis posterior es muy conocido, por ejemplo, para el análisis de muestras de sangre de recién nacidos en busca de enfermedades metabólicas hereditarias (21). Las ventajas de esto son la buena conservación de los componentes sanguíneos, el fácil transporte y el fácil almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, el uso de papel de filtro y de métodos similares para el secado y el almacenamiento de muestras de sangre luego de la incubación con compuestos de prueba no ha sido utilizado ni descrito antes posiblemente porque se preveía que fuera imposible o impracticable.

Skogstrand et al (22) dan a conocer un método para preparar una muestra de sangre para el análisis que consiste en sembrar gotas de sangre en papel de filtro, permitir que se sequen y posteriormente analizar dichas muestras de sangre seca en busca de marcadores inflamatorios.

60 Aburuz et al (24) y Koal et al (25) dan a conocer métodos para preparar una muestra de sangre en la que la sangre se siembra como gotas en papel de filtro, se seca y posteriormente se analiza.

Resumen de la invención

Esta invención da a conocer un método para preparar una muestra de sangre (u otro líquido biológico) para análisis, donde dicho método consiste en

- 5 (a) iniciar una reacción mediante mezcla de una muestra de sangre (u otro líquido biológico) con un compuesto de prueba, donde el compuesto de prueba interacciona con los componentes de la muestra de sangre (u otro líquido biológico) para causar una alteración en la composición de la muestra de sangre (u otro líquido biológico)
- 10 (b) detener la reacción sembrando gotas de sangre (u otro líquido biológico) en papel de filtro; donde el compuesto de prueba se elige entre una toxina, un alérgeno, un autoantígeno, una proteína o un polisacárido bacterianos, una proteína viral, una proteína o un polisacárido fúngicos, una proteína o un polisacárido de un parásito o un lipopolisacárido bacteriano.

Divulgación detallada de la invención

15 La presente invención da a conocer un método que consiste en mezclar una muestra de sangre u otro líquido biológico con un compuesto de prueba y sembrar gotas de sangre u otro líquido biológico en papel de filtro para el análisis posterior del efecto de dicho compuesto de prueba sobre la muestra de sangre u otro líquido biológico. El líquido biológico puede ser líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido quístico, líquido amniótico, líquido de lavado, saliva, extracto celular o extracto tisular. El compuesto se elige entre un aminoácido, un péptido, una

20 proteína, un carbohidrato, un oligosacárido, un polisacárido, una glucoproteína, un lípido, una lipoproteína, un glucosaminoglucano, una hormona, un esteroide, una vitamina, un compuesto sintético o natural de bajo peso molecular que afecta a la sangre para causar una alteración de su composición por ejemplo una toxina, un alérgeno, un autoantígeno, una proteína o un polisacárido bacterianos, una proteína viral, una proteína o un polisacárido fúngicos, una proteína o un polisacárido de un parásito o un lipopolisacárido bacteriano o cualquier otro compuesto relacionado con las enfermedades.

25 El método según la invención analiza la muestra para determinar el contenido de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento y/o neurotransmisores y otros polipéptidos y proteínas por ej. CRP, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, anticuerpos específicos (por ej, específicos del antígeno), transferrina, albúmina o transtiretina.

30 El efecto del compuesto de prueba se analiza mediante inmunoensayo, bioensayo, espectrometría de masas, HPLC, GC, GC-MS por ejemplo ensayos ELISA, ensayos FLISA, ensayos DELFIA, ensayos Luminex, ensayos de luminiscencia, ensayos de electroquimioluminiscencia, ensayos de proximidad de centelleo, radioinmunoensayos, MALDI-MS, ESI-MS y MS ambiental (por ej. DESI-MS).

35 También se da a conocer un método de mezcla de sangre u otro líquido biológico con un compuesto de prueba y la siembra de gotas de la mezcla en papel de filtro para el almacenamiento, el transporte o la manipulación antes del análisis posterior del efecto del compuesto de prueba sobre la sangre, el líquido biológico o la muestra.

40 Definiciones:

Analito significa cualquier compuesto que se puede detectar o cuantificar por medios analíticos.

45 Por el efecto del compuesto de prueba se entiende que éste interacciona con los componentes de la sangre o cualquier otro líquido biológico o muestra para causar una alteración de cualquier tipo en la composición de la sangre.

50 Secado significa eliminación del agua.

Papel de filtro significa cualquier trozo de papel, tela u otro material adecuado para recoger, secar y almacenar sangre.

55 Papel de PKU significa papel/papel de filtro utilizado para la detección sistemática del síndrome de fenilcetonuria en muestras de sangre de recién nacidos.

60 Sembrar gotas significa aplicar una muestra de sangre o cualquier otro líquido biológico o extracto o muestra a un trozo de papel estandarizado adecuado para tomar de forma precisa muestras de sangre. La siembra de gotas se realiza aplicando un volumen fijo de sangre a un trozo de papel o aplicando sangre al papel hasta que una zona definida quede cubierta de sangre. A continuación, el papel se deja secar completamente y se almacena inmediatamente en condiciones de baja humedad o se transporta a un lugar de almacenamiento para el análisis posterior.

Compuesto de prueba significa cualquier sustancia o compuesto químico, biológico o físico que se pueda mezclar

con, o añadirse a, sangre o cualquier otro líquido biológico o muestra.

Muestra significa cualquier formulación o mezcla de compuestos de prueba.

5 Se utilizan las abreviaturas siguientes:

- BCG significa Bacillus Calmette-Guerin
- BDNF significa factor neurotrófico derivado del cerebro
- BSA significa seroalbúmina bovina
- 10 CRP significa proteína C reactiva
- DBSS significa muestra de gotas de sangre seca
- EGF significa factor de crecimiento epidérmico
- ELISA significa enzimoanálisis de adsorción
- ELISPOT significa enzimoanálisis de recuento de puntos
- 15 ESI significa ionización por electronebulización
- FLISA significa inmunoensayo fluorescente
- GC significa cromatografía de gases
- G-CSF significa factor estimulante de las colonias de granulocitos
- GM-CSF significa factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos
- 20 HPLC significa cromatografía líquida de alto rendimiento
- IFN significa interferón
- Ig significa inmunoglobulina
- IGF significa factor de crecimiento semejante a la insulina
- Il significa interleucina
- 25 LPS significa lipopolisacárido
- MALDI significa desorción/ionización láser asistida por matriz
- M-CSF factor estimulante de las colonias de macrófagos
- MCP significa proteína quimioatrayente de monocitos
- MHC significa complejo mayor de histocompatibilidad
- 30 MIF significa factor inhibidor de la migración de macrófagos
- MIP significa proteína inflamatoria/inhibidora de macrófagos
- MMP significa metaloproteasa de matriz
- MS significa espectrometría de masas
- NT significa neurotrofina
- 35 PBS significa solución salina amortiguada con fosfato
- PCR significa reacción en cadena de la polimerasa
- PKU significa fenilcetonuria
- PPD significa derivado proteico purificado
- TGF significa factor de crecimiento transformante
- 40 TNF significa factor de necrosis tumoral
- TREM significa activación de receptores expresados en células mieloides
- VEGF significa factor de crecimiento endotelial vascular

45 La presente invención da a conocer un método en el que la reacción entre un compuesto de prueba y una muestra de sangre o cualquier otra muestra de líquido biológico se inicia, se deja continuar por un tiempo determinado y después se detiene sembrando gotas y/o secando la muestra en un papel de filtro que se utiliza posteriormente para el análisis del efecto del compuesto de prueba sobre la muestra de sangre o líquido y cualquiera de sus componentes.

50 En una realización preferida se extrae una muestra de sangre (por ejemplo 10 ml) de una persona utilizando recipientes para sangre con anticoagulantes, EDTA, heparina o citrato estándar o tubos de vidrio. La muestra de sangre se divide en dos alícuotas y se agrega un compuesto de prueba a una alícuota de la sangre, mientras que la otra alícuota se utiliza como una referencia de control a la cual se añade solamente el tampón/la solución en que se disuelve el compuesto de prueba. El compuesto de prueba también se puede agregar como un polvo sólido para disolver directamente en la sangre. Las muestras de sangre se incuban a temperatura ambiente o a una temperatura definida (por ejemplo, 5 °C, 20 °C, 37 °C) con o sin mezcla o agitación. A determinados intervalos de tiempo (por ejemplo 0.1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 10 h, 15 h, 20 h, 24 h, 48 h) se extraen alícuotas de las muestras de sangre y se siembran gotas en papel de filtro (por ejemplo, papel de PKU) y se dejan secar tan rápido como sea posible. Después de secar, el papel de filtro se puede utilizar inmediatamente para el análisis o almacenar para el análisis posterior. En una realización particular el papel de filtro se puede transportar (por ej. por correo ordinario) a cierta distancia antes del almacenamiento o el análisis en un laboratorio.

La siembra de gotas, el secado y el almacenamiento de la sangre se realizan de la manera siguiente: se siembran gotas de sangre en papel de filtro con un tubo capilar, una pipeta o similar en una sola capa y se secan a

- temperatura ambiente, por ejemplo, en una campana bien ventilada o en un lugar al ambiente. Para el almacenamiento, los papeles de filtro se pueden mantener en sobres de papel, bolsas de plástico o recipientes similares, preferentemente recipientes herméticos para mantener la humedad lo más baja posible. Es preferible una temperatura de almacenamiento de -20 °C o inferior, pero también es posible a temperatura ambiente siempre y cuando el papel se mantenga seco. Sin embargo, el almacenamiento puede tener lugar a temperatura ambiente o a una temperatura inferior a 0 °C (por ej., -20 °C, -50 °C, -80 °C, -180 °C) siempre que la humedad se mantenga baja para evitar el deterioro de las muestras. Las muestras se pueden almacenar durante períodos prolongados de tiempo (por ej. meses o años).
- 5
- 10 Los compuestos de prueba son toxinas, alérgenos, autoantígenos, proteínas y polisacáridos bacterianos, proteínas virales, proteínas y polisacáridos fúngicos, proteínas y polisacáridos de parásitos o lipopolisacáridos bacterianos. El uso de estos compuestos de prueba aportará un importante conocimiento sobre cómo un determinado compuesto afecta a las células y las señales entre las células.
- 15 En una realización, el método se usa para determinar el efecto de los compuestos tóxicos sobre la sangre, por ejemplo como parte de un programa de pruebas toxicológicas o un programa de ensayos preclínicos.
- El análisis de las muestras de sangre seca se puede llevar a cabo por diversas técnicas (por ejemplo inmunoensayo, bioensayo, espectrometría de masas, HPLC, GC, GC-MS). Los métodos preferidos de análisis son los ensayos ELISA, ensayos FLISA, ensayos DELFIA, ensayos Luminex, ensayos de luminiscencia, ensayos de electroquimioluminiscencia, ensayos de proximidad de centelleo, radioinmunoensayos, MALDI-MS, ESI-MS y PCR.
- 20
- La extracción de DBSS se puede llevar a cabo utilizando cualquier tampón o solvente adecuado. En una realización preferida, se perforan discos de papel de filtro, por ejemplo de 3.2 mm de diámetro, de DBSS o patrones en papel de filtro y se colocan juntos en pocillos de microtitulación. Se agregan a cada pocillo 140 µl o 180 µl (para mediciones dobles o triples, respectivamente) de tampón de extracción, PBS con "cóctel inhibidor de proteasa completo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)" (Roche, Alemania) 1 comprimido disuelto por 25 ml de tampón de ensayo (PBS con 0.5 por ciento de Tween 20 y 1% de BSA), y los analitos se extraen protegidos de la luz a temperatura ambiente en un agitador de placa fijado a 600 rpm, durante 60 minutos.
- 25
- 30 En una realización de la invención, los analitos se miden mediante un ensayo Luminex de la manera siguiente: se realiza el acoplamiento de anticuerpos de captura a perlas carboxiladas (Luminex corp., Austin Texas, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante: 2.5×10^6 perlas se lavan dos veces con tampón de activación (0.1 mol/l de fosfato de sodio, pH 6.2), se resuspenden en 80 µl de tampón de activación y se someten a ultrasonido hasta que se observa una distribución homogénea de las perlas. Se agregan 10 µl de soluciones de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS de Pierce, Rockford EE.UU.) y 10 µl de clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC de Pierce), ambos diluidos en tampón de activación a una concentración de 50 mg/ml, para estabilizar la reacción y activar las perlas. Después de mezclar, las perlas se incuban durante 20 min girando en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente las perlas activadas se lavan con tampón de acoplamiento (mmol/l de ácido 2-(N-morfolino etanosulfónico, MES), pH 5.0), se agregan 500 µl de solución de anticuerpo de captura exenta de azida (100 µg/ml) y se incuban girando durante 2 horas o toda la noche. La azida se elimina de los anticuerpos por diálisis (cassette de diálisis Slide-A-Lyzer®, MWCO = 10 000 de Pierce) en 3 l de PBS durante la noche a 4 °C. Después de la incubación, las perlas se lavan con tampón de lavado (PBS con un 0.05% de Tween 20) y se resuspenden en 75 µl de tampón de bloqueo/almacenamiento (PBS con 1% de seroalbúmina bovina (BSA) y 0.05% de azida sódica).
- 35
- 40
- 45 Las perlas se cuentan con un hemocitómetro, se ajustan hasta una concentración de 20×10^6 perlas/ml con el tampón de bloqueo/almacenamiento y se almacenan protegidas de la luz a 2-8 °C.
- El procedimiento del ensayo se realiza de la manera siguiente: una placa de filtro (MultiScreen MABVN 1.2 µm 96 pocillos, Millipore, Burlington EE.UU) se prepara humedeciéndola previamente con tampón de ensayo (PBS con 0.5% de Tween 20 y 1% de BSA). A cada pocillo se le agregan 50 µl de muestra transferidos con pipeta desde los pocillos de microtitulación luego de la extracción (100 µl divididos en duplicados o 150 µl divididos en triplicados) y una suspensión de 50 µl de perlas conjugadas a anticuerpos de captura, 1500 perlas por analito en tampón de ensayo que contiene 1% de suero de conejillo de Indias/cerdo (1:1). Los anticuerpos de captura reaccionan con los antígenos correspondientes durante 1½ hora de incubación y el material sin unir se elimina de las perlas filtrándolo a través de los pocillos utilizando un colector de vacío MultiScreen (Millipore). Las perlas se lavan dos veces con 200 µl de tampón de lavado (PBS con 0.5% de Tween) por pocillo. Los antígenos ahora capturados se hacen reaccionar durante 1½ hora con una mezcla (50 µl) de anticuerpos de detección biotinilados cada uno diluido 1:1000 en tampón de ensayo. Se agregan 50 µl de estreptavidina-ficoeritrina 20 µg/ml en tampón de ensayo (Molecular Probes, los Países Bajos) a los pocillos y la incubación continúa durante otros 30 minutos. Las perlas se lavan finalmente dos veces con 200 µl de tampón de lavado y se resuspenden en 125 µl de tampón de lavado. Después de 15 minutos de agitación, las muestras se analizan en el Luminex 100™ según las instrucciones del fabricante.
- 50
- 55
- 60

En una realización preferida, las muestras se analizan para determinar el contenido de citocinas, quimiocinas y

factores de crecimiento (por ejemplo las interleucinas como II-1, II-2, II-3, II-4, II-5, II-6, II-7, II-8, II-9, II-10, II-11, II-12, II-13, II-14, II-15, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-23, II-24, II-25, II-26, IFN, TNF, MCP, MIP, MMP-9, TREM, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, quimiocinas como CC, CXC, factores de crecimiento como TGF α , TGF β , EGF, VEGF, IGF I, IGF II, insulina, mediadores inflamatorios como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) y/o neurotransmisores.

En otra realización las muestras se analizan para determinar parámetros clínicos estándar y específicos como CRP, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, anticuerpos específicos (por ejemplo, específicos del antígeno), transferrina, albúmina, transtiretina, etc.

En otra realización el líquido biológico que se va a analizar es líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido quístico, líquido amniótico, líquido de lavado, saliva, extracto celular o extracto tisular.

Aún en otra realización la fuente de células son líneas celulares o células sanguíneas aisladas, células manipuladas, células transgénicas, células transfectadas o cualquier tipo de célula o tipo de célula alterada o manipulada.

La invención se puede aplicar a la sangre y otros líquidos corporales y extractos tisulares de cualquier especie y tipo de animal (por ej. ser humano, mono, ratón, rata, vaca, perro, caballo, gato, ave, pez y cualquier otra especie) incluidos los animales transgénicos.

En una realización especial el compuesto de prueba se inmoviliza en una superficie sólida (por ejemplo, papel de filtro) y luego se incuba con una muestra de sangre o líquido o extracto biológico. Luego de la incubación, el papel de filtro se deja secar o la sangre se siembra en gotas en el papel de filtro y se seca.

En un uso particular de la invención, el volumen de sangre, líquido o extracto biológico se ajusta para permitir la interacción con un compuesto inmovilizado o un compuesto en solución durante un tiempo fijo mientras se seca al mismo tiempo en el papel de filtro.

Las muestras de sangre pueden ser extraídas de individuos de prueba utilizando equipos y agujas estándar, y por personal capacitado. Sin embargo, la extracción de sangre puede también se puede llevar a cabo utilizando dispositivos que permitan la toma de muestra individual local.

Ejemplos

Ejemplo 1. Extracción, incubación, siembra de gotas, secado y almacenamiento de sangre.

Se extraen 10 ml de sangre de una persona de prueba en un tubo de ensayo con anticoagulante utilizando una jeringa y aguja estériles. La sangre se divide en alícuotas de 1 ml utilizando tubos de ensayo con anticoagulante estériles. De una muestra se siembra directamente en el papel una muestra de sangre hasta que se llene el círculo marcado (el volumen utilizado es de aproximadamente 0.2 ml). A los otros tubos de ensayo se les agregan los compuestos de prueba en concentraciones predeterminadas y los tubos de ensayo se incuban a 37 °C o a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se siembran muestras de 0.2 ml de cada tubo en papel de filtro. Las muestras de sangre se siembran en papel de filtro con un tubo capilar, una pipeta o similar en una sola capa y se secan a temperatura ambiente, por ej. en una cámara bien ventilada o en un lugar al ambiente. Después las muestras se almacenan a -20 °C o a temperatura ambiente en condiciones de baja humedad, de modo que el papel se mantenga seco. Con este fin, se pueden utilizar congeladores corrientes y los papeles se pueden mantener en sobres o en desecadores.

Ejemplo 2. Extracción de papel de filtro y análisis.

Se perforan dos discos de papel de filtro, de 3.2 mm de diámetro, de DBSS o patrones en papel de filtro y se colocan juntos en pocillos de microtitulación. Se agregan a cada pocillo 140 μ l o 180 μ l (para mediciones dobles o triples, respectivamente) de tampón de extracción, PBS con "cóctel inhibidor de proteasa completo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)" (Roche, Alemania) 1 comprimido disuelto por 25 ml de tampón de ensayo (PBS con 0.5 por ciento de Tween 20 y 1% de BSA), y los analitos se extraen protegidos de la luz a temperatura ambiente en un agitador de placa fijado a 600 rpm, durante 60 minutos.

Ejemplo 3. Ensayo Luminex

Acoplamiento de los anticuerpos a las perlas:

El acoplamiento de anticuerpos de captura a las perlas carboxiladas (Luminex corp., Austin Texas, EE.UU.) se realiza según las instrucciones del fabricante: 2.5 X 10⁶ perlas se lavan dos veces con tampón de activación (0.1 mol/l de fosfato de sodio, pH 6.2), se resuspenden en 80 μ l de tampón de activación y se someten a ultrasonido

5 hasta que se observa una distribución homogénea de las perlas. Se agregan 10 µl de soluciones de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS de Pierce, Rockford EE.UU.) y 10 µl de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC de Pierce), ambos diluidos en tampón de activación a una concentración de 50 mg/ml, para estabilizar la reacción y activar las perlas. Después de mezclar, las perlas se incuban durante 20 min girando en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente las perlas activadas se lavan con tampón de acoplamiento (mmol/l de ácido 2-(N-morfolino etanosulfónico, MES), pH 5.0), se agregan 500 µl de solución de anticuerpo de captura exenta de azida (100 µg/ml) y se incuban girando durante 2 horas o toda la noche. La azida se elimina de los anticuerpos por diálisis (cassette de diálisis Slide-A-Lyzer®, MWCO = 10 000 de Pierce) en 3 l de PBS durante la noche a 4 °C. Después de la incubación, las perlas se lavan con tampón de lavado (PBS con 0.05% de Tween 20) y se resuspenden en 75 µl de tampón de bloqueo/almacenamiento (PBS con 1% de seroalbúmina bovina (BSA) y 0.05% de azida sódica).

15 Las perlas se cuentan con un hemocitómetro, se ajustan hasta una concentración de 20×10^6 perlas/ml con el tampón de bloqueo/almacenamiento y se almacenan protegidas de la luz a 2-8 °C.

Ejemplo 4. Procedimiento del ensayo:

20 Una placa de filtro (MultiScreen MABVN 1.2 µm 96 pocillos, Millipore, Burlington EE.UU) se prepara humedeciéndola previamente con tampón de ensayo (PBS con 0.5% de Tween 20 y 1% de BSA). A cada pocillo se le agregan 50 µl de muestra transferidos con pipeta desde los pocillos de microtitulación luego de la extracción (100 µl divididos en duplicados o 150 µl divididos en triplicados) y una suspensión de 50 µl de perlas conjugadas a anticuerpos de captura, 1500 perlas por analito en tampón de ensayo que contiene 1% de suero de conejillo de Indias/cerdo (1:1). Los anticuerpos de captura reaccionan con los antígenos correspondientes durante 1½ hora de incubación y el material sin unir se elimina de las perlas filtrándolo a través de los pocillos utilizando un colector de vacío MultiScreen (Millipore). Las perlas se lavan dos veces con 200 µl de tampón de lavado (PBS con 0.5% de Tween) por pocillo. Los antígenos ahora capturados se hacen reaccionar durante 1½ hora con una mezcla (50 µl) de anticuerpos de detección biotinilados cada uno diluido 1:1000 en tampón de ensayo. Se agregan 50 µl de estreptavidina-ficoeritrina 20 µg/ml en tampón de ensayo (Molecular Probes, los Países Bajos) a los pocillos y la incubación continúa durante otros 30 minutos. Las perlas se lavan finalmente dos veces con 200 µl de tampón de lavado y se resuspenden en 125 µl de tampón de lavado. Después de 15 minutos de agitación, las muestras se analizan en el Luminex 100™ según las instrucciones del fabricante.

35 Ejemplo 5. Prueba de globulina Gc, toxoide diftérico, toxoide tetánico y lipopolisacárido (LPS) para la liberación de citocinas

Las 13 soluciones siguientes se mezclan con sangre de diferentes personas y se incuban a 37 °C:

- 40 1) 1 ml de EDTA-sangre (persona X) + 30 µl de Gc lote 11
- 2) 1 ml de EDTA-sangre (persona X) + 30 µl de Gc lote 13
- 3) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de Gc lote 11
- 4) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de Gc lote 13
- 5) 1 ml de EDTA-sangre (persona X) + 30 µl de PBS
- 6) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de PBS
- 45 7) 1 ml de EDTA-sangre (persona X) + 30 µl de Gc lote 11 + 50 µl de LPS de *Klebsiella pneumoniae* (5 mg/ml)
- 8) 1 ml de EDTA-sangre (persona X) + 50 µl de LPS de *Klebsiella pneumoniae* (5 mg/ml)
- 9) 1 ml de EDTA-sangre (persona Z) + 30 µl de toxoide diftérico (5.78 mg/ml)
- 10) 1 ml de EDTA-sangre (persona Z) + 30 µl de toxoide tetánico (993 Lf/ml)
- 50 11) 1 ml de EDTA-sangre (persona Z) + 30 µl de LPS de *Klebsiella pneumoniae* (5 mg/ml)
- 12) 1 ml de EDTA-sangre (persona Z) + 30 µl de LPS de *Salmonella typhimurium* (5 mg/ml)
- 13) 1 ml de EDTA-sangre (persona Z) + 30 µl de agua milliQ

Después de 1 min (A), 2 h (B), 24 h (C) y 48 h(D) se siembran 180 µl de cada una de las 13 soluciones en papel de filtro y se dejan secar. Posteriormente las muestras (después de 14 días de almacenamiento a -20 °C) se analizan para determinar el contenido de citocinas utilizando tecnología Luminex (22). Los resultados se muestran en la tabla 1. Se puede ver en la tabla que el LPS induce aumentos grandes en IL-1b IL-6, IL-8, MIP-1a, MIP-1b, mientras que se observan cambios más pequeños pero estadísticamente significativos para otros analitos. El toxoide diftérico induce un aumento en MIP-1b

Tabla 1. Prueba de globulina Gc, toxoide diftérico, toxoide tetánico y lipopolisacárido (LPS) para la liberación de citocinas (véase el ejemplo 5 por detalles). Todos los resultados se informan en pg/ml a menos que se indique lo contrario.

5
10
15
20
25
30
35
40

Ana- lito	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-17	IL-18	sIL-6ra ng/ml	IFN- g	TNF-a	TNF-b	MCP- 1	TGF-b
1A	120	33	18	57	62	155	297	104	188	3674	1269,4	137	137	470	1795	828
1B	71	26	14	55	52	148	289	91	138	2985	970,3	96	105	427	1462	594
1C	111	31	24	48	35	7592	289	89	191	2357	695,2	36	85	519	1339	616
1D	101	17	20	60	42	5680	279	89	156	1444	620,4	75	88	355	1296	1007
2A	10	30	11	47	35	124	232	71	140	2818	900,9	39	69	503	1442	560
2B	47	21	18	49	44	210	232	80	163	2637	902,8	60	78	427	1296	700
2C	73	25	22	61	46	8471	258	93	161	2802	874,9	119	90	503	1391	937
2D	104	34	21	45	35	7588	262	78	115	1758	799,5	84	76	412	800	789
3A	<3	9	6	20	4	25	45	12	101	1502	516,9	24	17	213	889	91
3B	45	12	8	35	36	50	258	73	147	1600	498,1	28	70	434	903	430
3C	38	17	7	30	18	1956	80	25	101	1050	395,5	11	48	293	597	282
3D	55	15	6	40	43	2882	129	53	135	732	402,8	39	72	149	737	458
4A	69	24	7	44	38	77	272	102	138	2308	769,9	107	115	358	1472	557
4B	38	16	13	39	29	69	120	17	117	2003	613,8	28	56	332	1569	255
4C	43	25	18	36	47	2456	117	64	182	1317	537,8	30	102	351	903	477
4D	8	7	16	37	17	3346	43	39	94	727	430,0	15	70	165	597	414
5A	32	21	16	19	20	84	80	60	133	2535	876,4	39	95	427	1616	490
5B	25	22	11	29	18	110	67	25	122	2581	870,3	46	65	383	1391	446
5C	1	4	12	26	<3	3695	23	<3	70	1874	636,0	<3	26	261	889	273
5D	69	19	21	43	16	6488	166	44	122	1543	735,2	25	74	204	1540	870
6A	20	15	7	25	22	94	155	69	133	1980	651,5	74	105	284	1401	479
6B	45	24	16	37	44	68	82	80	152	1980	600,3	60	86	289	1124	506
6C	30	8	8	36	20	3055	61	2	67	1058	411,7	29	48	104	889	417
6D	<3	<3	<3	<3	<3	1781	<3	<3	<3	155	138,1	<3	<3	<6	<6	<50
7A	<3	24	15	24	26	81	115	27	124	2213	802,3	11	38	332	1472	183
7B	1223	25	24	28	578	2982	84	78	165	2234	712,3	14	724	371	1172	446
7C	14429	20	23	36	14077	13606	204	115	244	2686	706,2	964	1399	418	1422	529
7D	9413	15	15	39	11048	15148	117	108	228	1567	540,9	468	1020	342	860	594
8A	901	23	15	28	40	237	103	29	152	2627	915,1	41	52	341	1597	450
8B	1584	19	19	40	789	3494	101	66	251	2380	820,7	80	997	518	1328	344

45
50
55

8C	11466	18	26	33	12878	13903	345	119	320	1809	620,1	339	1512	468	1391	705
8D	7402	16	12	23	11902	14428	222	95	219	878	562,9	190	1471	268	753	438
9B	148	33	20	20	21	1785	46	12	88	1058	833,4	<3	81	350	875	624
9C	138	28	23	31	17	10091	3	12	149	1272	724,8	1	95	316	652	894
10B	25	37	22	15	14	383	92	7	106	1042	820,7	4	44	303	931	357
10C	69	28	22	23	11	9921	39	<3	110	987	664,7	6	61	268	56	578
11B	2948	24	43	21	1697	58145	103	78	183	1456	442,1	68	1205	222	489	623
11C	16953	37	24	66	4215	757774	299	73	264	1070	374,1	73	983	274	91	528
12B	1665	26	19	46	1539	16428	25	28	148	1153	382,8	129	844	388	247	479
12C	12805	32	21	39	3715	541309	100	70	268	1450	339,3	80	750	274	680	907
13B	83	17	14	37	<3	252	7	51	70	1017	351,4	27	19	328	389	554
13C	60	29	17	21	<3	67105	2	44	74	1384	361,4	225	40	326	273	508

ES 2 471 980 T3

Analito	MIP-1a	MIP-1b	MMP-9 µg/ml	TREM-1	BDNF ng/ml	GM-CSF	NT-4	CRP µg/ml	RANTES ng/ml	desv.est. int. %
1A	286	1313	1,40	3509	16,2	63	85	0,68	188,0	32
1B	174	1285	1,19	3917	11,2	52	84	0,53	136,8	10
1C	221	1091	1,36	2609	14,2	62	43	0,43	158,3	-7
1D	210	549	1,05	2848	14,2	112	105	0,40	118,8	21
2A	254	1387	1,20	2848	11,9	65	90	0,49	153,0	-4
2B	192	1305	1,12	3001	11,6	88	57	0,53	116,7	7
2C	200	1055	1,33	2925	17,7	88	72	0,52	191,1	20
2D	219	677	1,16	3223	19,1	170	110	0,44	160,8	12
3A	73	852	1,15	2609	6,2	25	35	0,38	55,6	-8
3B	106	1067	1,15	2443	6,9	86	52	0,57	50,2	15
3C	154	627	1,26	2181	8,9	45	40	0,36	57,9	-5
3D	137	193	1,13	2690	8,9	82	47	0,38	51,7	13
4A	192	1124	1,59	3983	10,8	51	100	0,93	97,3	37
4B	112	996	1,51	2609	9,7	60	60	0,48	92,1	9
4C	201	716	1,37	2925	11,0	83	70	0,51	88,8	6
4D	96	199	1,32	1696	11,0	85	53	0,37	82,7	1
5A	192	1327	1,11	1358	11,0	41	43	0,48	127,2	-4
5B	167	1196	1,02	1800	10,9	22	57	0,44	119,8	-7
5C	88	940	1,03	2690	11,8	15	47	0,30	115,6	-6
5D	219	702	1,30	3001	17,4	76	85	0,37	176,5	3
6A	187	919	1,37	3223	9,5	68	74	0,63	84,2	18
6B	214	1087	1,31	3438	8,3	59	82	0,58	70,6	15
6C	118	495	1,19	2090	8,0	<6	42	0,36	59,9	4
6D	<6	<6	0,72	<313	2,9	<6	<3	0,03	20,3	-53
7A	51	1097	0,97	1231	9,2	48	45	0,38	118,4	-41
7B	4706	21819	1,05	<313	10,4	100	55	0,34	129,4	-1
7C	15802	32037	1,05	3076	15,6	76	67	0,34	159,3	-1
7D	15112	29767	0,74	2443	12,6	114	74	0,31	116,9	-4

8A	257	1349	1,09	3438	11,2	70	77	0,42	130,7	-3
8B	5333	24582	1,13	3368	11,8	91	105	0,42	112,4	10
8C	14303	31580	1,04	3296	10,9	100	63	0,36	144,6	2
8D	14937	28500	0,89	1476	13,4	106	30	0,28	106,3	-3
9B	591	6076	1,42	1996	22,8	59	35	0,60	161,3	-1
9C	643	5472	1,28	1476	26,2	83	55	0,55	141,6	-9
10B	96	1099	1,43	2090	20,0	82	53	0,60	154,9	-8
10C	141	950	1,26	1899	23,7	59	55	0,50	137,7	-6
11B	5992	22797	2,10	2920	30,1	14	51	1,08	240,6	10
11C	11035	26838	1,51	2087	32,8	15	63	0,83	183,0	2
12B	4055	19656	1,81	2920	18,8	10	24	0,92	163,0	5
12C	8644	26995	1,45	3257	26,2	23	15	0,76	175,0	-9
13B	142	1351	1,50	2747	16,7	12	35	0,86	159,8	-10
13C	77	1087	1,67	2920	22,9	2	13	0,76	164,7	-2

Ejemplo 6. Prueba de toxoide diftérico, toxoide tetánico, tuberculina PPD y BCG para la liberación de citocinas.

Las 6 soluciones siguientes se mezclan y se incuban a 37 °C:

- 1) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de toxoide diftérico (5.78 mg/ml)
- 2) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de toxoide tetánico (993 Lf/ml)
- 3) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de BCG (4-16 x 10⁶ ufc/ml)
- 4) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de tuberculina PPD (0.4 µg/ml)
- 5) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de agua milliQ
- 6) 1 ml de EDTA-sangre (persona Y) + 30 µl de solvente de vacuna BCG (control)

Después de 1 min (A), 2 h (B), 4 h (C) 6 h (D) y 24 h (E) se sembraron 180 µl de cada una de las 6 soluciones en papel filtro y se dejaron secar. Posteriormente las muestras (luego del almacenamiento a -20 °C durante 30 días) se analizan para determinar el contenido de citocinas utilizando tecnología Luminex (22).

Los resultados se muestran en la tabla 2.

- 5 En la tabla se observa que BCG induce un gran aumento de IL-8 y MIP-1b en comparación con el control. Del mismo modo, el toxoide diftérico, el toxoide tetánico y PPD inducen incrementos en IL-8 y MIP-1b, mientras que se observan cambios más pequeños pero estadísticamente significativos para otros analitos.

10 **Tabla 2. Prueba de toxoide diftérico, toxoide tetánico, tuberculina PPD y BCG para la liberación de citocinas (véase el ejemplo 6 por detalles). Todos los resultados se informan en pg/ml a menos que se indique lo contrario.**

Analito	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-17	IL-18
1A	47	42	9	11	161	99	477	160	73	2609
1B	54	76	11	14	130	284	394	201	69	3761
1C	90	146	27	8	115	588	637	226	87	2564
1D	97	124	26	22	217	783	706	267	111	3282
1E	106	153	17	20	135	7290	981	336	83	1745
2A	29	8	4	11	73	95	61	132	43	2233
2B	44	77	13	7	93	135	410	217	47	2202
2C	43	82	14	10	103	187	493	233	68	2726
2D	57	113	16	12	110	234	468	139	86	3265
2E	54	120	8	10	143	6335	811	185	63	1707
3A	33	26	26	33	75	113	240	213	78	2934
3B	77	93	14	2	97	268	268	158	56	2556
3C	160	155	11	18	127	998	533	252	54	2763
3D	145	<3	24	13	49	1439	378	76	54	3104
3E	113	92	3	10	67	27779	202	120	75	1597
4A	152	96	2	4	125	149	323	183	47	2461
4B	43	268	16	20	64	160	286	137	53	2512
4C	31	79	14	20	60	189	376	140	77	2567
4D	665	71	568	687	493	465	1812	746	1355	3170
4E	70	<3	8	13	81	7011	386	202	59	2432
5A	48	68	14	9	26	136	259	77	34	2660
5B	44	220	14	3	46	117	168	109	38	2461
5C	23	195	2	8	63	114	444	76	64	2221
5D	25	179	9	11	100	174	350	133	60	2982
5E	30	218	13	8	25	3558	417	146	79	1478
6A	27	121	16	10	46	126	461	154	51	2406
6B	32	95	10	3	34	128	400	149	41	2353
6C	19	101	13	24	9	131	256	91	71	2413
6D	50	102	7	22	70	163	281	183	51	2876
6E	27	97	10	11	87	5038	404	155	69	1474

Analito	sIL-6ra ng/ml	IFN-g	TNF-a	TNF-b	MCP-1	TGF-b
1A	1016,9	78	61	1392	2869	816
1B	1218,9	118	39	1474	2288	210
1C	822,0	209	109	1569	2126	556
1D	1091,7	165	150	1872	3048	791
1E	863,0	155	136	1724	2213	852
2A	857,1	72	158	1329	1600	276
2B	839,0	57	7	1865	1760	554
2C	955,2	52	90	1390	1794	515

ES 2 471 980 T3

2D	1095,0	109	77	1599	2838	582
2E	835,5	91	34	1308	1990	551
3A	981,4	<3	69	1187	1506	671
3B	851,1	59	60	1291	2041	471
3C	985,7	153	59	1454	2543	405
3D	1045,6	67	48	1351	1500	542
3E	787,5	9	112	1183	1240	508
4A	941,4	71	60	1807	2800	623
4B	833,1	107	72	1310	1766	527
4C	937,6	165	112	1563	1211	384
4D	1186,3	93	247	2142	6253	113
4E	966,0	6	59	1012	1234	579
5A	885,7	5	35	1283	1473	305
5B	887,3	62	21	1593	2341	284
5C	735,4	229	65	1522	1262	520
5D	1042,6	154	129	1535	2441	426
5E	802,9	172	69	1602	107	256
6A	852,2	122	45	1674	1996	627
6B	758,5	41	97	1664	1189	372
6C	695,6	30	62	1492	884	378
6D	943,3	177	16	1516	736	473
6E	808,6	60	91	1305	1256	619

Analito	MIP-1a	MIP-1b	MMP-9 µg/ml	TREM-1	BDNF ng/ml	GM- CSF	NT-4	CRP µg/ml	RAN- TES ng/ml	desv.est int. %
1A	85	1307	11,3	5676	8,0	21	23	0,46	56,2	6
1B	182	2534	15,6	6485	12,2	22	24	0,55	62,8	-1
1C	210	2883	14,1	6254	10,9	22	17	0,49	59,0	5
1D	224	3102	17,2	6562	13,0	26	33	0,57	71,8	9
1E	205	1053	14,3	5792	10,6	45	41	0,48	65,3	0
2A	75	1308	7,4	4821	7,1	19	16	0,38	50,0	-1
2B	116	1345	13,1	5599	8,3	24	13	0,41	55,1	3
2C	99	1163	17,7	5521	10,7	18	24	0,50	63,2	0
2D	70	1234	19,1	5521	10,7	25	20	0,53	59,3	1
2E	125	375	27,0	5985	11,4	41	23	0,45	56,9	0
3A	112	1189	12,0	7747	8,3	17	28	0,48	45,3	-4
3B	235	3717	8,1	5289	9,0	20	14	0,39	41,8	4
3C	410	7922	15,3	4860	9,2	20	26	0,45	41,5	2
3D	296	8706	10,8	7289	11,0	23	20	0,44	47,3	1
3E	281	6280	14,2	4232	12,3	33	17	0,38	42,5	-12
4A	128	1397	11,0	5715	9,1	20	20	0,47	39,6	4
4B	110	1159	10,7	5483	8,5	17	24	0,46	46,3	-1
4C	45	1122	10,0	3356	9,5	18	22	0,45	46,0	-4

4D	866	1301	15,4	21919	12,4	36	447	0,44	43,3	-5
4E	64	183	19,6	5521	8,3	37	15	0,45	47,3	-11
5A	69	993	15,3	4938	9,4	19	16	0,46	44,6	-5
5B	4	1087	10,4	4743	8,9	19	15	0,39	43,2	2
5C	60	1248	8,1	5521	8,3	23	15	0,45	45,6	2
5D	41	1296	21,3	4035	12,5	28	20	0,52	50,5	3
5E	35	388	8,7	4272	10,7	42	5	0,40	46,1	-17
6A	57	1200	11,8	6331	8,2	19	13	0,45	49,1	1
6B	98	1117	13,5	7251	8,5	21	18	0,42	48,6	0
6C	85	1228	10,1	5016	7,5	22	33	0,40	46,4	-7
6D	66	1118	20,6	6101	9,6	27	24	0,47	49,5	4
6E	83	256	11,9	4469	10,7	39	14	0,39	50,8	-9

50 Ejemplo 7. Almacenamiento de muestras durante periodos de tiempo prolongados.

Las muestras de sangre sembradas secas (DBSS) se deben almacenar secas y preferentemente a aproximadamente -20 °C. También se puede utilizar la temperatura ambiente en la medida en que las muestras se protejan de la humedad.

5 En Dinamarca todas las DBSS residuales han sido almacenados desde 1982 en un banco de muestras biológicas a -24 °C, de conformidad con las normas del Ministerio de Salud (23). Para estudios de estabilidad, se tomaron anónimamente DBSS almacenadas durante 23 años, 3 años y 1 mes respectivamente, del Banco de muestras de DBSS danés. Se calcularon las concentraciones medias de cada analito para cada período de las 10 muestras y se compararon con DBSS anónimas recogidas rutinariamente que habían sido almacenadas en el laboratorio durante dos semanas a -20 °C (Tabla 3). Se puede observar que dentro del error experimental, no hay ningún deterioro de las muestras incluso tras 23 años de almacenamiento.

15 **Tabla 3. Análisis de muestras durante períodos de tiempo cortos (1 mes), largos (3 años) y prolongados (23 años). Los resultados se expresan como porcentaje de la concentración detectable en DBSS de 2 semanas que aún no se almacenaron en el biobanco de PKU. Las muestras se extrajeron y analizaron como se describe en los ejemplos 2-4.**

	23 años	3 años	1 mes
IL-1 β	44	43	93
IL-2	116	115	113
20 IL-4	91	91	107
IL-5	105	116	122
IL-6	95	101	108
IL-8	28	38	64
25 IL-10	124	103	129
IL-12	95	108	107
IL-17	94	100	107
IL-18	138	113	129
30 TNF- α	92	101	109
TNF- β	88	94	93
IFN- γ	117	119	121
RANTES	87	89	90
35 MCP-1	94	112	112
GM-CSF	102	107	108
MIP-1 α	85	88	98
MIP-1 β	59	76	79
40 sIL-6ra	48	101	113
TGF- β	111	100	95
MMP-9	57	49	93
TREM-1	68	84	129
CRP	73	123	110
45 BDNF	22	54	58
NT-4	54	63	111

References

1. Beck WS (Ed.). Hematology. MIT Press 1985.
2. Bloom AL, Thomas, DP (Eds.). Haemostasis and thrombosis. Longman 1987.
- 5 3. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Immunobiology. Elsevier 1999.
4. Thadikkaran L, Siegenthaler MA, Crettaz D, Queloz PA, Schneider P, Tissot JD. Recent advances in blood-related proteomics, *Proteomics*. 2005;5:3019-34.
5. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002; 1:845-67.
- 10 6. Steinke JW, Borish L. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:S441-5.
7. Blach-Olszewska Z. Innate immunity: cells, receptors, and signaling path-ways. *Arch Immunol Ther Exp*. 2005;53:245-53.
8. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30:973-81.
- 15 9. Cravens PD, Lipsky PE. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol*. 2002;80:497-505.
10. Villas BH. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis*. 1998;5:56-61,
11. Stelzer GT, Robinson JP. Flow cytometric evaluation of leukocyte function. *Diagn Clin Immunol*. 1988;5:223-31.
12. Jerome KR, Sloan DD, Aubert M. Measurement of CTL-induced cytotoxicity: the caspase 3 assay. *Apoptosis*. 2003;8:563-7
- 20 13. Andersen MH, Schrama D, Straten TP, Becker JC, Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;12G:32-41,
14. Troutt AB, Maraskovsky E, Rogers LA, Pech MH, Kelso A. Quantitative analysis of lymphokine expression in vivo and in vitro. *Immunol Cell Biol*. 1992;70:51-7.
15. Schmittel A, Keilholz U, Thiel E, Scheibenbogen C. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay. *J Immunother*. 2000;23:289-95.
- 25 16. House RV. Theory and practice of cytokine assessment in immunotoxicology. *Methods*. 1999;19:17-27.
17. Meidenbauer N, Hoffmann TK, Donnenberg AD. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes. *Methods*. 2003;31:160-71.
18. Bousso P. Generation of MHC-peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune responses. *Microbes Infect*. 2000;2:425-9.
- 30 19. Hogrefe WR. Biomarkers and assessment of vaccine responses, *Biomarkers*. 2005;10:S50-7.
20. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:363-8G.
21. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr*. 2001;131:16315-6S.
- 35 22. Skogstrand K, Thorsen P, Norgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sorensen LC, Hougaard DM. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem*. 2005;51:1854-G6.
23. Norgaard-Pedersen B, Simonsen H. Biological specimen banks in neonatal screening. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88:106-9.
- 40 24. Aburuz S et al. Dried blood spot liquid chromatography assay for therapeutic drug monitoring of metformin. *Journal of Chromatography B* 2006; 832: 202-207.
25. Koal T et al. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 2005; 19: 2995-3001
- 45

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una muestra de sangre u otro líquido biológico para su análisis, donde dicho método consiste en
- 5 (a) iniciar una reacción mediante mezcla de una muestra de sangre u otro líquido biológico con un compuesto de prueba, donde el compuesto de prueba interacciona con los componentes de la muestra de sangre u otro líquido biológico para causar una alteración en la composición de la muestra de sangre u otro líquido biológico
- 10 (b) detener la reacción sembrando gotas de la mezcla de sangre u otro líquido biológico y el compuesto de prueba en papel de filtro;
- donde el compuesto de prueba se elige entre una toxina, un alérgeno, un autoantígeno, una proteína o un polisacárido bacterianos, una proteína viral, una proteína o un polisacárido fúngicos, una proteína o un polisacárido de un parásito o un lipopolisacárido bacteriano.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el líquido biológico que se va a analizar es líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido quístico, líquido amniótico, líquido de lavado, saliva, extracto celular o extracto tisular.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 donde el trato celular deriva de líneas celulares, células sanguíneas aisladas, células manipuladas, células transgénicas, células transinfectadas o cualquier tipo de célula o tipo de célula alterada o manipulada.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, donde la muestra se analiza para determinar el contenido de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento y/o neurotransmisores u otros polipéptidos y proteínas.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 a 4 donde la muestra se analiza para determinar el contenido de parámetros clínicos como CRP, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, anticuerpos específicos (por ejemplo, específicos del antígeno), transferrina, albúmina y/o transtiretina.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, donde el efecto del compuesto de prueba se analiza mediante inmunoensayo, bioensayo, espectrometría de masas, HPLC, GC, GC-MS.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, donde los métodos de análisis preferidos son ensayos ELISA, ensayos FLISA, ensayos DELFIA, ensayos de luminiscencia, ensayos de electroquimioluminiscencia, ensayo de proximidad de centelleo, radioinmunoensayos, MALDI-MS, ESI-MS y MS ambiental (por ej. DESI-MS).
- 35 8. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1a 7, donde el compuesto de prueba se inmoviliza en una superficie sólida y se incuba con la muestra de sangre o líquido biológico.
- 40 9. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además:
- (c) analizar el efecto del compuesto de prueba sobre la muestra de sangre u otro líquido biológico.