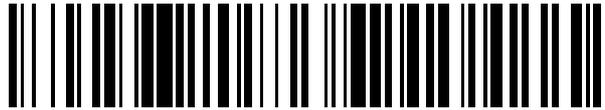


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 783**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2012 E 12711151 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2689236**

54 Título: **Procedimiento citológico que utiliza la autofluorescencia de los glóbulos blancos para el diagnóstico precoz y el seguimiento de las infecciones**

30 Prioridad:

22.03.2011 FR 1152356

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

14.05.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE NANTES (25.0%)
1, quai de Tourville
44000 Nantes, FR;
UNIVERSITE PARIS-SUD 11 (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%) y
CHU NANTES (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ASEHNOUNE, KARIM;
FONTAINE-AUPART, MARIE-PIERRE;
LECART, SANDRINE;
MONSEL, ANTOINE y
ROQUILLY, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 535 783 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 citológico que utiliza la autofluorescencia de los glóbulos blancos para el diagnóstico precoz y el seguimiento de las infecciones.

5

Técnica anterior

La sepsis severa o infección bacteriana grave sigue siendo una causa importante de morbi-mortalidad hospitalaria, más precisamente en las unidades de cuidados intensivos o de reanimación. Su incidencia actual de 3 a 11 casos por 1000 habitantes en Estados Unidos ha aumentado de hecho el 8,7% por año estos diez últimos años. El 14,6% de las admisiones en las unidades de reanimación francesas están relacionadas con esta patología. A pesar de numerosos progresos en los procedimientos diagnósticos y terapéuticos, la mortalidad hospitalaria relacionada con la sepsis severa se estima en el 35% en Francia. Se ha demostrado actualmente de manera clara que el periodo de tiempo que separa la admisión de pacientes del inicio de la antibioterapia constituye un importante factor pronóstico de mortalidad. El objetivo es, por lo tanto, en el siglo 21, diagnosticar la infección lo más pronto posible, lo que es una garantía de supervivencia de los pacientes.

10

15

20

Además, uno de los desafíos actuales en medicina es poder reducir la masa global de antibióticos utilizados diariamente con el fin de combatir los efectos nocivos de su empleo masivo (resistencia bacteriana y costes económicos). La duración de los tratamientos con antibióticos de las infecciones bacterianas está actualmente en el centro de los principales debates. Son así necesarias técnicas rápidas de monitorización de la infección en curso y por lo tanto de la eficacia de los tratamientos anti-infecciosos empleados. Estas técnicas permitirán detener los tratamientos en el momento adecuado y darán lugar a un acortamiento del tiempo de los tratamientos con antibióticos. Por lo tanto, conllevarán una reducción del consumo mundial de antibióticos.

25

30

Ahora bien, las técnicas microbiológicas clásicas actualmente disponibles que constituyen el examen directo y el cultivo sobre medios nutritivos, no permiten el acceso a una respuesta rápida. En efecto, son necesarias de 24 a 48 horas para la obtención de una respuesta diagnóstica bacteriológica. Asimismo, las técnicas de amplificación génica (RT-PCR por ejemplo) son muy caras, ya que utilizan unos aparatos sofisticados y no están todavía completamente validadas en una indicación diagnóstica.

35

Para sustituir estas técnicas microbiológicas o genéticas, existe por lo tanto una necesidad urgente de desarrollar unos procedimientos fiables y poco costosos, que permitan diagnosticar infecciones de manera bastante precoz en su desarrollo, de manera mucho más rápida de lo que está permitido actualmente.

40

45

50

Ahora bien, se sabe que la respuesta del huésped a los microorganismos se establece en los primeros minutos de la infección: de hecho es casi inmediata. Los glóbulos blancos, células clave de la inmunidad innata, desempeñan un papel fundamental y muy precoz en el reconocimiento y la destrucción de los agentes patógenos. Estos mecanismos de defensa del huésped contra los microbios (bacterias y virus) están bajo la dependencia de receptores específicos, los receptores Toll-like (TLR). Varios de estos TLR desempeñan un papel primordial en el reconocimiento de las bacterias: el TLR4, por ejemplo, reconoce los componentes de la membrana de las bacterias gram-negativas, como el lipopolisacárido (LPS), mientras que el TLR2 reconoce unos elementos de las bacterias gram positivas, como el peptidoglicano (PGN). Los TLR3, 7 y 8 son unos receptores endosomales que reconocen los ARN de los virus. Una vez estimulados, estos TLR tienen como característica común dar lugar a la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias NF- κ B dependientes, como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) y la interleucina 6 (IL-6). Por otra parte, otra vía de señalización constituye un mecanismo de defensa importante de la inmunidad innata: la vía del receptor de la N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP). Este péptido, producido de la degradación de proteínas bacterianas, activa un receptor acoplado a proteínas G que da lugar a una cascada de activación de quinasas intra-citoplásmicas que llevan a la fosforilación de sub-unidades cuyo ensamblaje forma la NADH-oxidasa. Este complejo enzimático membranario permite que los monocitos y los neutrófilos polinucleares (PNN) produzcan unas especies reactivas del oxígeno (ERO) oxidando el NADH en NAD. Estos ERO participan en la actividad bactericida de los fagocitos.

55

60

Los presentes inventores muestran en la presente memoria que es posible utilizar, en condiciones experimentales muy particulares, la autofluorescencia de estos glóbulos blancos para revelar la actividad inmunitaria precoz que se establece durante la infección microbiana (y por lo tanto el estado infeccioso de un individuo). El procedimiento de diagnóstico de la invención utiliza un material óptico de rutina que permite trabajar en unos ámbitos de longitudes de onda compatibles con la autofluorescencia celular, y constituye así una ayuda rápida, fiable y poco costosa para el diagnóstico de una infección en un individuo. Permite también controlar muy rápidamente la eficacia de las terapias anti-infecciosas establecidas previamente.

Resumen de la invención

65

La presente invención se refiere en primer lugar a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar el estado infeccioso de un individuo a partir de una muestra de glóbulos blancos procedentes de una extracción biológica de dicho individuo, que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- i) medir la intensidad celular mediante autofluorescencia de dicha muestra, y
- ii) comparar la intensidad medida en la etapa i) con un valor control, con el fin de determinar el estado infeccioso de dicho individuo.

En un modo de realización particular, los glóbulos blancos de dicha muestra se seleccionan de entre los monocitos y/o los neutrófilos polinucleares. En este modo de realización de la invención, cuando el estado de dicho individuo es infeccioso, dicho individuo padece una infección bacteriana, viral o fúngica, preferentemente bacteriana.

Preferentemente, dicha extracción biológica es un fluido procedente de un órgano potencialmente infectado de dicho individuo, de manera aún más preferida, esta extracción es un fluido pulmonar, un líquido de ascitis, un fluido cefalorraquídeo, una extracción sanguínea o cualquier otro fluido biológico procedente de un órgano potencialmente infectado.

En un modo de realización preferido, la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se mide sobre células fijadas químicamente, mediante un microscopio de fluorescencia, un citómetro de flujo, un espectrofluorímetro o cualquier otro dispositivo óptico capaz de medir la fluorescencia.

En un modo de realización preferido entre todos, la muestra de células se prepara en monocapa sobre portaobjetos de material transparente, preferentemente de vidrio, previamente a la etapa i), según un procedimiento que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- a) depositar unas células de dicha muestra en por lo menos un sistema de citocentrifugación,
- b) centrifugar el dispositivo obtenido en la etapa a), preferentemente a aproximadamente 600 rpm durante aproximadamente 5 minutos, con el fin de proyectar las células sobre dicho portaobjetos,
- c) fijar las células así proyectadas sobre el portaobjetos para formar una muestra celular, con por lo menos una gota de paraformaldehído (PFA) al 4% aproximadamente, preferentemente durante 10 minutos aproximadamente,
- d) aclarar la muestra celular anteriormente fijada, preferentemente con un tampón PBS,
- e) dejar secar la muestra celular anteriormente aclarada,
- f) añadir sobre la muestra celular anteriormente secada por lo menos una gota de un medio de montaje compatible con la observación de la fluorescencia,
- g) fijar una laminilla cubreobjetos transparente, preferentemente de vidrio, sobre la muestra celular procedente de la etapa f).

Cuando los glóbulos blancos de dicha muestra son mayoritariamente unos monocitos, el estado de dicho individuo es infeccioso si la intensidad de la autofluorescencia medida en la etapa i) es significativamente superior al valor de control.

Cuando los glóbulos blancos de dicha muestra son mayoritariamente unos polinucleares neutrófilos, el estado de dicho individuo es infeccioso si la intensidad de la autofluorescencia medida en la etapa i) es significativamente inferior al valor control.

Leyenda de las figuras

La figura 1 está constituida por dos imágenes (A, B) tomadas por un microscopio confocal, que revela la autofluorescencia de monocitos y polinucleares neutrófilos procedentes de portaobjetos citológicos de lavados bronco-alveolares (LBA) en un modelo murino de neumonía por *Staphylococcus aureus*.

La figura 2 representa las variaciones de la intensidad de autofluorescencia (If) en función del tiempo de los monocitos humanos según diferentes condiciones de estimulaciones.

La figura 3 ilustra la intensidad de la autofluorescencia (If) de los monocitos-macrófagos y de los PNN extraídos en los lavados broncoalveolares (LBA, en negro) en unos modelos murinos de neumonías por *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*. El ruido de fondo se representa mediante barras.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la presente invención utiliza la autofluorescencia de células particulares del sistema inmunitario

para diagnosticar la presencia de agentes bacterianos y/o virales en un individuo de riesgo. Los patógenos infecciosos bacterianos y/o víricos son capaces, mediante la activación de los TLR, de provocar una actividad metabólica precoz en estas células inmunitarias. Esta actividad metabólica podría estar correlacionada con variaciones de concentración del NAD(P)H, una de las coenzimas esenciales implicadas en el metabolismo energético celular, caracterizado por su autofluorescencia intracelular (Mayevsky A *et al.*, Am J. Physiol. Cell Physiol. 2007).

Esta señal fluorescente endógena, habitualmente molesta en el ámbito de estudios que utilizan unas sondas fluorescentes, ya se aprovecha en el campo de la cancerología y del metabolismo celular, permitiendo su estudio discriminar unos estados metabólicos diversos (US nº 6.289.236, Palmer GM *et al.*, Photochem Photobiol 2003; Li BH *et al.*, World J. Gastroenterol. 2006). Sin embargo, no se ha descrito ni sugerido nunca ninguna prueba diagnóstica que utilice la autofluorescencia de células del sistema inmunitario, y en particular las identificadas por los presentes inventores.

En este campo, sólo se han realizado dos estudios: por un lado, el equipo de Petty y sus colaboradores han demostrado la oscilación temporal y espacial de la señal de autofluorescencia en polinucleares neutrófilos estimulados por unos agonistas inmunitarios, intentando caracterizar diferentes estados de activación de estas células (Petty H.R. *et al.*, PNAS 2001; 98:3145-3149). Este estudio recuerda que la autofluorescencia de los neutrófilos y de los monocitos se debe principalmente a la presencia de NADH, que sufre unas oscilaciones temporales y desplazamientos intracelulares importantes, que pueden ser inducidos por unas señales de activación bacteriana. Es importante señalar que la señal estudiada es una señal de variación ondulatoria de la intensidad de autofluorescencia en el tiempo y espacio sobre una escala temporal de 0,1 μ s a 20 μ s, y en una escala espacial de algunos micrómetros. Las modificaciones ondulatorias espacio-temporales tienen lugar, por lo tanto, en un intervalo temporal infinitesimal que sucede a la estimulación inmune *in vitro* de los PNN (algunos μ s después de la estimulación por el agonista inmunitario en cuestión). Estos resultados disuaden, por lo tanto, de utilizar estas fluctuaciones de autofluorescencia, demasiado breves en el tiempo y demasiado localizadas en el espacio, para un procedimiento de diagnóstico. En efecto, en la perspectiva de un procedimiento de diagnóstico, es necesario que el estado metabólico modificado desde el tiempo T1 de la infección sea estable en el tiempo y cuantificable en el momento T2 de la extracción de la muestra. El intervalo de tiempo que separa la estimulación de células de interés y la puesta en evidencia del estado metabólico activado que representa en la práctica de algunas horas hasta varios días, no es por lo tanto absolutamente compatible con las escalas de tiempo descritas en Petty *et al.*

El segundo estudio se refiere a la puesta en evidencia del efecto del tabaco sobre la autofluorescencia de los macrófagos del pulmón. Pauly *et al.* han identificado, en efecto, que el tabaquismo aumentaba la intensidad de esta autofluorescencia (Pauly J.L. *et al.*, Microsc Res Tech 2005).

Por otra parte, la solicitud de patente internacional WO 99/50642 describe un procedimiento para diagnosticar infecciones, basado en el aprovechamiento de la autofluorescencia de plasma entero de pacientes que sufren una infección viral (virus del sida o virus de la hepatitis) para establecer unas características espectrales de emisión que discriminan el plasma de los pacientes enfermos de los del control. El procedimiento de la presente invención no aprovecha la autofluorescencia del plasma (como lo propone el documento WO 99/50642), sino la autofluorescencia de células precisas, a saber unas células inmunitarias (y preferentemente entre estas células los monocitos y los polinucleares neutrófilos), que procedan de sangre total o de órganos potencialmente infectados.

Yeong *et al.*, Ann. Clin. Lab. Sci. 39(2), 2009, 114-119 sugiere un procedimiento *in vitro* para diagnosticar el estado infeccioso de un individuo basado en la determinación de la fluorescencia de los neutrófilos en presencia de bis(Zn2+-dipicolilamina) que forma un complejo fluorescente con el fosfato de NADP.

Los presentes inventores han desarrollado por primera vez un protocolo experimental que permite aprovechar la autofluorescencia de los glóbulos blancos, y en particular las modulaciones de esta autofluorescencia relacionadas con su activación. Proponen así un sistema reproducible fiable y eficaz para evaluar el estado infeccioso de individuos diana.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere por lo tanto a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar el estado infeccioso de un individuo a partir de una muestra de células inmunitarias procedentes de una extracción biológica de dicho individuo, comprendiendo dicho procedimiento por lo menos las etapas siguientes:

i) medir la intensidad celular mediante la autofluorescencia de dicha muestra, y

ii) comparar la intensidad medida en la etapa i) con un valor control, con el fin de determinar el estado infeccioso de dicho individuo.

En el campo de la presente invención, cuando el estado de un individuo es "infeccioso", dicho individuo está infectado por un microorganismo, preferentemente por una bacteria, un virus o un hongo (levadura o filamento). De manera aún más preferida, dicho individuo sufre una infección bacteriana. Este estado puede haber sido ya diagnosticado anteriormente y el individuo puede estar sometido a un tratamiento antiinfeccioso (antibiótico). En este

caso, el procedimiento de diagnóstico de la invención está destinado a evaluar si la infección está todavía presente y/o si se puede detener el tratamiento.

Por "individuo" se entiende en la presente memoria un animal o un mamífero, y en particular el ser humano.

Una extracción "biológica" se define en la presente invención como cualquier extracción de fluido biológico, preferentemente procedente de órganos potencialmente infectados y que contienen por lo tanto glóbulos blancos. En el campo de la presente invención, es posible extraer por ejemplo una muestra de fluido pulmonar (en el caso de neumonías), de ascitis (en las infecciones de líquido de ascitis), de líquido cefalorraquídeo (en las meningitis) o de sangre, o de cualquier otro órgano potencialmente infectado.

En el sentido de la presente invención "obtener una muestra de células procedente de una extracción biológica" consiste en 1) extraer una muestra de fluido biológico de un individuo, preferentemente de un órgano de un individuo, y 2) específicamente en el ámbito de la extracción sanguínea, purificar a partir de esta muestra las células de interés por los procedimientos clásicos de biología celular, para obtener la muestra de células purificadas.

Cabe señalar que la etapa opcional de purificación celular para la obtención preferida de las células de interés no es necesaria cuando se utiliza un fluido biológico distinto de la sangre. En efecto, para los otros fluidos extraídos (fluido pulmonar, líquido cefalorraquídeo o de ascitis) en caso de infección, estos fluidos contendrán en su gran mayoría unas células de interés (PNN y monocitos), y por lo tanto no será necesario purificarlos.

En el caso de una extracción sanguínea, el volumen extraído es preferentemente de por lo menos 10 ml-20 ml, con el fin de obtener suficientes células de interés después de la purificación. En el caso de una extracción de un fluido procedente de un órgano, son suficientes algunos ml (de 500 µl a 1 ml por pocillos de citospin).

La muestra de células que se puede utilizar en el procedimiento de diagnóstico de la invención puede ser bien conservada a temperatura ambiente para ser utilizada de manera extemporánea (en la práctica, menos de 5 horas después de la extracción), o bien conservada a temperatura de 4°C con el fin de preservar la integridad de las células hasta las operaciones de purificación/aislamiento celular, fijación y/o de medición de la intensidad de la autofluorescencia.

En el sentido de la presente invención, "la intensidad celular media de la autofluorescencia" medida en la etapa i) del procedimiento de diagnóstico de la invención es la intensidad total de la autofluorescencia para una suspensión celular, o un valor medio celular obtenido sobre por lo menos aproximadamente 50 células, preferentemente de manera aproximada 100 células. Es conveniente entonces 1) sustraer a este valor total el valor de la autofluorescencia que se debe a células contaminadoras eventuales, y 2) dividir esta intensidad restante por el número de células de interés (monocitos o polinucleares neutrófilos) presentes en la muestra estudiada. Este valor final será la intensidad celular media en el sentido de la presente invención.

Numerosos programas permiten en la actualidad obtener instantáneamente una cuantificación de los niveles de autofluorescencia celular y realizar la media para un gran número de células (por ejemplo, Métamorph, ImageJ, Imaris o cualquier otro programa de tratamiento de imagen conocido por el experto en la materia).

El valor "control" (o "estándar") con el que conviene comparar la intensidad de la autofluorescencia del individuo a testar es la intensidad de la autofluorescencia media celular obtenida a partir de un gran número de células aisladas que provienen de varios individuos sanos que no toman ningún tratamiento desde hace por lo menos 7 días (en particular ni antibiótico, ni antiinflamatorio), que no presentan ninguna infección detectable declarada (ninguna señal/síntoma infeccioso, tal como por ejemplo: fiebre, fatiga, dolores, etc.). Este valor control se calcula típicamente sobre por lo menos 100 células aisladas a partir de por lo menos 5 individuos sanos. Se ha calculado previamente utilizando los parámetros experimentales estándares que se utilizarán para el paciente testado (en particular en términos de material óptico utilizado, modo de fijación de las células, longitudes de onda de excitación, de emisión, temperatura, pH, etc.).

Las células inmunitarias, denominadas también "glóbulos blancos" o "leucocitos" son unas células de la sangre humana que contiene un núcleo mono- o multilobulado, que desempeñan esencialmente un papel en la defensa del organismo contra los agentes extraños dentro de la inmunidad innata. Entre los glóbulos blancos, se distinguen las células mononucleares (linfocitos B, linfocitos T, monocitos y macrófagos) de los polinucleares (o "granulocitos" que son los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos) (Keneth M. Murphy, Paul Travers, & Mark Walport, Janeway's immunobiology. 7ª edición).

De manera preferida, en el campo de la presente invención, los glóbulos blancos de dicha muestra se seleccionan de entre los monocitos y/o los neutrófilos polinucleares.

En una variante del procedimiento de diagnóstico de la invención, la muestra celular contiene preferentemente por lo menos aproximadamente el 80%, preferentemente de manera aproximada el 90% de PNN, de manera aún más preferida por lo menos aproximadamente el 95% de PNN.

Algunos fluidos biológicos extraídos directamente de unos órganos son conocidos por contener sólo PNN. Por ejemplo, los fluidos de lavado broncoalveolares así como la ascitis contienen principalmente PNN (E.Pilly, *Maladies infectieuses et tropicales*, 22ª edición, 2010). En este caso, no será necesaria una etapa de purificación previa.

Preferentemente, la muestra de fluido biológico utilizada en la presente invención no sufre ninguna etapa de purificación ya que contiene naturalmente por lo menos aproximadamente el 80%, preferentemente aproximadamente el 90% de PNN, de manera aún más preferida por lo menos aproximadamente el 95% de PNN. La muestra de fluido biológico es por lo tanto preferentemente una muestra de LBA, de ascitis o de líquido cefalorraquídeo (LCR).

Sin embargo, si una etapa de purificación fuese necesaria para obtener una muestra de célula utilizable en el procedimiento de la invención (en particular en el caso de una muestra sanguínea), es preferible aislar en primer lugar las células polinucleadas sanguíneas, y después, mediante unas técnicas conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo la selección por separación sobre columna magnética (ani-CD16), obtener los polinucleares neutrófilos. Para obtener una muestra de células polinucleadas a partir de un fluido biológico, conviene utilizar una de las técnicas bien conocidas por el experto en la materia. A título de ejemplo, se puede citar la técnica del gradiente de densidad y, después extraer el anillo inferior, que corresponde esencialmente a las células polinucleares (véase la técnica Cederlane®, Tebu-bio, descrita en los ejemplos siguientes).

La mayoría de las neumonías presentan unas fórmulas principalmente neutrofilicas (en su mayoría PNN). Sin embargo, algunas son en su mayoría monocitarias o mixtas (50/50). Estas proporciones dependen del agente patógeno responsable de la neumonía, del individuo y/o del estado más o menos avanzado de la neumonía. Todos los fluidos biológicos designados en la invención (sangre, fluido pulmonar, líquido cefalorraquídeo o ascitis) pueden contener unos monocitos de manera mayoritaria en algunos casos particulares de infección.

En otra variante del procedimiento de diagnóstico de la invención, la muestra celular contiene por lo tanto preferentemente por lo menos aproximadamente el 80%, preferentemente aproximadamente el 90% de monocitos, y de manera aún más preferida por lo menos aproximadamente el 95% de monocitos.

Preferentemente, la muestra de fluido biológico utilizado en la presente invención no sufre ninguna etapa de purificación ya que contiene naturalmente por lo menos aproximadamente el 80%, preferentemente aproximadamente el 90%, de monocitos, de manera aún más preferida por lo menos aproximadamente el 95% de monocitos (en el caso de fluido pulmonar, líquido cefalorraquídeo o ascitis).

Si una etapa de purificación fuese necesaria (la muestra es por ejemplo una muestra de sangre), los monocitos pueden ser aislados a partir de células mononucleadas mediante unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia. A título de ejemplo, se puede efectuar una selección positiva por separación sobre columna magnética (anticuerpo anti-CD14). Para obtener una muestra de células mononucleadas (linfocitos, monocitos y macrófagos) a partir de un fluido biológico, es preferible utilizar unas técnicas de biología celular bien conocidas por el experto en la materia. A título de ejemplo, se puede utilizar la técnica del gradiente de densidad, y después extraer el anillo superior que está constituido por estas células (véase la técnica Cederlane®, Tebu-bio, descrita en los ejemplos siguientes).

La fluorescencia es la propiedad que posee una molécula para emitir un fotón para volver de su estado excitado (tras la absorción de otro fotón) a su estado fundamental. Las células contienen unas moléculas que pueden volverse fluorescentes cuando están excitadas con unos rayos de longitudes de onda en el visible o en el ultravioleta (UV). Esta emisión de fluorescencia, que emana de fluoróforos endógenos, es una propiedad intrínseca de las células denominada "auto-fluorescencia" o "fluorescencia endógena" y debe ser distinguida de las señales de fluorescencia obtenidas por adición de marcadores exógenos. Los fluoróforos conocidos son: los aminoácidos aromáticos, los pigmentos lipofílicos, el NADPH, las flavinas y las porfirinas. La autofluorescencia no necesita ningún marcado específico (Monici M., *Biotechnol Annu Rev.* 2005).

La fuente luminosa impuesta por el procedimiento puede por lo tanto adoptar cualquier forma de herramienta óptica al tiempo que es capaz de proporcionar una intensidad luminosa suficientemente potente en el campo de longitud de onda en cuestión. Si las fuentes LASER UV (argón) son capaces de proporcionar un haz incidente con tales características, también se pueden utilizar otras herramientas ópticas capaces de proporcionar unas gamas de longitud de ondas compatibles con la excitación de NADH celular. Este es el caso de algunas lámparas (mercurio, halógeno, etc.) de diodo LASER y de LASER blanco (que emite un espectro de emisión continuo en una amplia gama de longitud de onda).

Para revelar y medir la autofluorescencia biológica, es posible utilizar 1) unas células en suspensión, es decir unas células que no están unidas a un soporte, y evolucionan libremente en un medio líquido apropiado, o 2) unas células fijadas sobre un soporte transparente, preferentemente un portaobjetos de vidrio.

Según un modo particular de la invención, la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se

mide sobre unas células en suspensión. En este modo particular, la autofluorescencia se puede medir con unos sistemas que miden la fluorescencia sin que un observador pueda ver estas células, por ejemplo por citometría de flujo, por espectrofotometría o por microespectrofluorimetría.

5 En este caso, la medición de la intensidad media de la autofluorescencia se realiza automáticamente por unos sistemas (citómetros de flujo, espectrofotómetros) que miden la fluorescencia total de cada muestra.

10 En otro modo particular de la invención, la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se mide sobre unas células fijadas químicamente y dispuestas en un portaobjetos compatible con la observación de la fluorescencia, preferentemente un portaobjetos transparente de vidrio, y la autofluorescencia se mide entonces con unos aparatos de microscopía de fluorescencia convencional (microscopio de epifluorescencia), de microscopía confocal o bifotónica.

15 La medición de la intensidad media de la autofluorescencia se realiza entonces mediante un programa de tratamiento de imagen, siendo ésta obtenida a partir de un dispositivo adecuado, tal como una cámara acoplada a un microscopio.

20 Sin querer limitarse a ello, se puede utilizar, en el campo de la presente invención, un citómetro de flujo, un espectrofotómetro clásico, o cualquier otro tipo de microscopio que permita obtener una señal de fluorescencia por diagnóstico por imagen de intensidad o por recuento de fotón.

En un modo de realización preferido de la invención, la intensidad de la autofluorescencia se mide, para unas células fijadas en un portaobjetos transparente de vidrio, con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia convencional.

25 En un modo de realización aún más preferido de la invención, la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se mide con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia que excita las células con una longitud de onda que va de 300 nm aproximadamente hasta 600 nm aproximadamente, preferentemente que va de 350 nm aproximadamente hasta 450 nm aproximadamente. Esta excitación se realiza preferentemente utilizando una fuente láser UV.

30 Por otra parte, la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra medida en la etapa i) de la presente invención es preferentemente la emitida a una longitud de onda que va de 400 nm aproximadamente hasta 700 nm aproximadamente, preferentemente que va de 450 nm aproximadamente hasta 600 nm aproximadamente.

35 En un modo de realización muy particular, la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se mide en la etapa i) del procedimiento de diagnóstico de la invención con la ayuda de un microscopio de fluorescencia confocal que utiliza una fuente láser Argón UV continua, un fotomultiplicador sensible en el campo de longitud de onda que va de 400 nm aproximadamente hasta 550 nm aproximadamente, un pinhole abierto y un objetivo X63/1.4 de inmersión en aceite.

40 En un modo de realización de la invención, la medición de la intensidad celular media de la autofluorescencia se efectúa sobre unas células vivas.

45 De manera preferida, estas células vivas se aislaron a partir de un órgano, y se volvieron a poner en suspensión preferentemente en medio líquido en un dispositivo de cultivo transferible sobre una herramienta óptica de explotación (como el pocillo de cultivo celular o LabTek[®] empleado en la primera fase experimental descrita a continuación).

50 En este caso, los presentes inventores han demostrado que era importante, para medir de manera fiable y reproducible, la autofluorescencia sobre células vivas, mantener el pH y la temperatura el medio de cultivo a un valor constante (pH preferentemente comprendido entre 7 y 8, de manera aún más preferida de valor 7,4, y temperatura mantenida a 37°C) durante toda la duración de la medición de la autofluorescencia. En el caso contrario, los valores de la intensidad de la autofluorescencia medidos serán menos fiables y menos reproducibles.

55 Sin embargo, en un modo de realización preferido de la invención, la intensidad de la autofluorescencia de las células de la muestra se mide sobre unas células fijadas químicamente, es decir fijadas en un estado metabólico celular particular, por ejemplo con la ayuda de paraformaldehído.

60 En este modo de realización, las células de la extracción biológica se fijan químicamente lo más rápido posible, preferentemente menos de 5 horas, después de la extracción de la muestra biológica. En efecto, fijando los glóbulos blancos en cierto estado, lo que se estudia es una instantánea metabólica celular. Esto permite librarse de todas las dificultades técnicas relacionadas con la perpetuación de un estado vivo celular que impondría un procedimiento de estudio sobre células vivas. Por ello, es importante minimizar el tiempo entre la fijación de las células de la muestra y la extracción de la muestra. Cabe señalar el caso particular de las extracciones sanguíneas, en el que la etapa de purificación puede tener lugar sólo en células vivas y por lo tanto antes de cualquier etapa de fijación.

65

Los presentes inventores han ensayado varios modos de fijación, y varios sistemas de montaje sobre portaobjetos con el fin de obtener una medición fiable de la autofluorescencia para los dos tipos de células inmunitarias (monocitos y PNN, véase el ejemplo 3) siguiente). De este modo, han identificado un protocolo común de tratamiento de la muestra celular adaptado a las limitaciones del procedimiento de la invención, es decir que asegura una señal de autofluorescencia suficiente que permite obtener unos resultados fiables y reproducibles para estos dos tipos celulares.

En este modo de realización preferido, las células deben ser preparadas en monocapa por citocentrifugación sobre un portaobjetos de microscopía de vidrio, antes de ser fijadas sobre dicho portaobjetos con paraformaldehído (PFA), lavadas, secadas y después finalmente montadas en un medio de montaje compatible con la observación de la fluorescencia antes de ser recubiertas con una laminilla cubreobjetos de vidrio.

Más precisamente, en este modo de realización particular del procedimiento de la invención, la muestra de células se prepara en monocapa sobre portaobjetos de material transparente, preferentemente de vidrio, antes de la etapa i), según un procedimiento que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- a) depositar unas células de dicha muestra en por lo menos un sistema de citocentrifugación,
- b) centrifugar el dispositivo obtenido en la etapa a), preferentemente a aproximadamente 600 rpm durante aproximadamente 5 minutos, con el fin de proyectar las células sobre dicho portaobjetos,
- c) fijar químicamente las células así proyectadas sobre el portaobjetos para formar una muestra celular con por lo menos una gota de paraformaldehído (PFA) al 4% aproximadamente, preferentemente durante aproximadamente 10 minutos,
- d) aclarar la muestra celular anteriormente fijada, preferentemente con un tampón PBS,
- e) dejar secar la muestra celular anteriormente aclarada,
- f) añadir sobre la muestra celular anteriormente secada por lo menos una gota de un medio de montaje compatible con la observación de la fluorescencia,
- g) fijar una laminilla cubreobjetos transparente, preferentemente de vidrio, sobre la muestra celular procedente de la etapa f).

En este modo de realización muy particular, la etapa i) de medición de la intensidad celular media de la autofluorescencia de la muestra se lleva a cabo con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

Durante la etapa a), el número de células introducidas en el pocillo del sistema de centrifugación está ventajosamente comprendido entre 500000 y 1000000 en 500 µl a 1 ml de volumen por pocillo.

Estas células son depositadas en un sistema de citocentrifugación de tipo cytospin (por ejemplo, el comercializado por Thermo Electron Corporation con el nombre de Shandon cytospin[®]) que está constituido por un pocillo acoplado a un portaobjetos de microscopio transparente, preferentemente de vidrio.

La citocentrifugación es una tecnología bien conocida en la actualidad que permite depositar las células de interés puestas en el pocillo en una zona bien definida sobre un portaobjetos de microscopio de material transparente, preferentemente de vidrio, en una monocapa, y permite la absorción del líquido residual por el filtro de la cámara de muestra. Durante el funcionamiento de la centrifugadora, el movimiento rotatorio del instrumento inclina los pocillos en posición recta y centrifuga las células sobre la zona de depósito del portaobjetos, proporcionando a todas las células la misma posibilidad de ser expuestas.

El portaobjetos transparente en el que se depositan las células de interés (o "portaobjetos de microscopio") es preferentemente un portaobjetos de vidrio adecuado para el análisis de la fluorescencia celular, de un grosor comprendido entre 1,2 mm y 1,5 mm, preferentemente 1,5 mm, tal como los comercializados por Fisher Scientific.

El dispositivo obtenido en la etapa a) se centrifuga después. Esta centrifugación de la etapa b) se efectúa entre 400 y 1000 rpm, preferentemente a aproximadamente 600 rpm (41 g) durante aproximadamente 5 minutos.

Para realizar la etapa c), el portaobjetos de microscopio se saca después de la centrifugadora, y la muestra celular obtenida después de la etapa b) se fija químicamente con una solución de paraformaldehído (PFA), diluida en una solución de PBS con una concentración comprendida entre el 2 y el 6% aproximadamente, y siendo preferentemente de aproximadamente 5%.

La cantidad de PFA es ventajosamente de aproximadamente 15 µl de paraformaldehído (PFA) para 10⁶ células aproximadamente, o también una gota de 1 ml de PFA en la muestra celular proyectada sobre el portaobjetos.

El tiempo de fijación con el PFA está comprendido entre 2 minutos y 20 minutos, y es preferentemente de aproximadamente 10 minutos.

5 La muestra celular fijada se aclara después, por ejemplo con PBS, para eliminar el PFA restante (etapa d)), se necesitan en general 3 lavados con el fin de eliminar eficazmente el PFA restante.

Durante la etapa e), la muestra celular se seca completamente, por ejemplo con aire durante el tiempo necesario de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente.

10 La muestra celular es después recubierta con una gota (preferentemente 20 μ l) de un medio de montaje compatible con la observación de la fluorescencia. Este medio es, por ejemplo, el medio de montaje "ProLong[®] Gold" o "Fluoromount", o también "Vectachield Slow Fade". Preferentemente, este medio es el "ProLong[®] Gold".

15 Por último, la muestra debe ser después recubierta con una laminilla cubreobjetos adecuada para la medición de la fluorescencia, preferentemente de vidrio, típicamente de 0,13 a 0,17 mm de grosor, como las propuestas por Fisher Scientific.

20 Los presentes inventores han demostrado que, comparando la intensidad celular media de la autofluorescencia de la muestra del paciente testado con el valor denominado "control" cuando los glóbulos blancos de dicha muestra son mayoritariamente unos monocitos, el estado de dicho individuo es infeccioso si la intensidad de la autofluorescencia medida en la etapa i) es significativamente superior al valor control.

25 En otras palabras, si una muestra de células que comprende por lo menos aproximadamente el 70%, preferentemente por lo menos aproximadamente el 80%, de manera aún más preferida por lo menos aproximadamente el 90% de monocitos, emite una señal de autofluorescencia significativamente más importante que el valor control, entonces el individuo al que se le ha extraído la muestra de fluido biológico padece infección (o está todavía infectado) bacteriana, viral o fúngica.

30 El término "significativamente superior" significa en el campo de la presente invención que la relación [intensidad media celular del paciente]/[valor control] es como mínimo de aproximadamente 1,2, ventajosamente comprendida entre 1,3 y 3 aproximadamente, de manera preferida comprendida entre 1,5 y 2 aproximadamente.

35 Los presentes inventores han demostrado que, a la inversa, comparando la intensidad celular media de la autofluorescencia de la muestra del paciente testado con el valor denominado "control" cuando los glóbulos blancos de dicha muestra son mayoritariamente unos polinucleares neutrófilos, el estado de dicho individuo es infeccioso si la intensidad de la autofluorescencia medida en la etapa i) es significativamente inferior al valor control.

40 La diferencia de resultado entre las dos poblaciones celulares puede encontrar su explicación, entre otras, en la naturaleza metabólica tan diferente de estas dos células.

45 En otras palabras, si una muestra de células que comprende por lo menos aproximadamente el 70%, preferentemente por lo menos aproximadamente el 80%, de manera aún más preferida por lo menos aproximadamente el 90% de polinucleares neutrófilos, emite una señal de autofluorescencia significativamente más débil que el valor control, entonces el individuo al que se ha extraído la muestra de fluido biológico padece infección (o está todavía infectado) bacteriana, viral o fúngica.

50 El término "significativamente inferior" significa, en el campo de la presente invención, que la relación [intensidad media celular del paciente]/[valor control] es como máximo de aproximadamente 0,8, ventajosamente comprendida entre 0,1 y 0,7 aproximadamente, de manera preferida comprendida entre 0,1 y 0,6 aproximadamente.

55 La invención describe también un procedimiento de preparación de una muestra celular fijada destinada a ser utilizada en el procedimiento de diagnóstico tal como el descrito anteriormente, y que comprende las etapas siguientes:

- a) depositar las células en por lo menos un sistema de citocentrifugación,
- b) centrifugar el dispositivo obtenido en la etapa a), preferentemente a aproximadamente 600 rpm, es decir 41 g durante aproximadamente 5 minutos, con el fin de proyectar unas células sobre dicho portaobjetos,
- c) fijar químicamente las células así proyectadas sobre el portaobjetos, formando una muestra celular, con por lo menos una gota de paraformaldehído (PFA) al 4% aproximadamente, preferentemente durante 10 minutos aproximadamente,
- d) aclarar la muestra celular anteriormente fijado, preferentemente con un tampón PBS,

- e) dejar secar la muestra celular anteriormente aclarada,
- f) añadir sobre la muestra celular anteriormente secada por lo menos una gota de un medio de montaje compatible con la observación de la fluorescencia, y
- g) fijar una laminilla cubreobjetos transparente, preferentemente de vidrio, sobre la muestra celular procedente de la etapa f).

Las etapas a) a g) son tales como las descritas anteriormente.

Ventajosamente, este procedimiento de preparación se podría realizar de manera automática por medio de robots capaces de efectuar estas etapas de manera secuencial.

Otra ventaja del procedimiento de diagnóstico de la invención reside en el hecho de que se podría realizar de manera totalmente automática a partir de un solo aparato compacto:

- 1) preparación automática de la muestra del paciente
- 2) medición automática de la autofluorescencia celular media de las muestras,
- 3) comparación de los valores con los valores control,
- 4) salida del resultado: presencia de un agente bacteriano, viral o fúngico en dicho paciente.

Este sistema automatizado tiene la ventaja de ser mucho más rápido que las técnicas microbiológicas utilizadas actualmente, y mucho menos costoso que las técnicas genéticas que pretenden identificar la presencia de un agente infeccioso que además permanecen incompletamente validadas, en particular en los casos de infecciones bacterianas.

Ejemplos

1) Reactivos y material utilizados

La sangre total se extrajo en unos tubos BD Vacutainer® de 4,5 ml con 0,5 ml de citratos de sodio al 3,8% (p/v). El medio de cultivo RPMI 1640 procede del laboratorio Invitrogen® (Paisley, Reino Unido).

El gradiente de densidad: Lympholyte-Poly® procede del laboratorio Cedarlane Tebu-bio® (Le Perrey-en-Yvelines, Francia). El kit MACS® para el aislamiento de los monocitos así como de los anticuerpos anti-CD 14 procede de los laboratorios Miltenyi biotec® (Paris). El lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli 0111:B4 purificado procede del laboratorio Sigma® (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos de América). El Pam3Csk4 (en lo sucesivo PAM) procede del laboratorio InvivoGen®, (San Diego, Estados Unidos de América). El fMLP procede del laboratorio Sigma-Aldrich® (St Quentin Fallavier, Francia). Las cámaras de observación estériles para microscopía confocal Lab-Tek® proceden del laboratorio Brands Products® (Estados Unidos de América). Las placas de 24 pocillos y los tubos cónicos estériles proceden del laboratorio Falcon®, Becton Dickinson Labware (Europa, Le Pont de Claix, Francia). El medio de montaje específico ProLong® Gold antifade reagent procede del laboratorio Invitrogen (ref.: P36934). La centrifugadora que permite la citocentrifugación y la proyección sobre portaobjetos de las muestras celulares es la Shandon Cytospin® Centrifuge.

El microscopio disponible en la plataforma de diagnóstico de imagen del centro de Photonique biomédicale de Orsay es un microscopio confocal TCS SP5® de la marca Leica®. Dispone de 4 láseres continuos (2 láseres Helium-Néon 633 nm y 543 nm, un láser Argón visible 458 nm, 476 nm, 488 nm y 514 nm y un láser Argón UV 351 nm y 364 nm) de un láser de Titanio/Zafiro infrarrojo de alta frecuencia de pulso. El primer modo de adquisición utilizado es el de análisis en intensidad de fluorescencia (I_i) cuantificado en UA.

2) Condiciones de adquisición de la señal de autofluorescencia de NAD(P)H

A partir de las primeras observaciones celulares, se han fijado las condiciones experimentales óptimas que dan el mejor compromiso en términos de resolución de imagen de intensidad de la autofluorescencia de NAD(P)H, y de deterioro de la muestra biológica.

Para la adquisición de la señal de intensidad de fluorescencia, se ha utilizado la fuente láser Argón UV continua ($\lambda = 364$ nm, $P = 1,3$ mW), así como un fotomultiplicador (ganancia = 1250V) en el campo de longitud de onda que va de 400 nm a 550 nm, con un pinhole abierto a un 1/3 de apertura máxima, con un objetivo X 63 de inmersión en aceite. Para la visualización de la imagen en I_i , se ha aplicado una media de 4 imágenes con una resolución de 1024 píxeles/1024 píxeles para un tamaño final de 246 μm /246 μm .

3) Demostración del aprovechamiento de la autofluorescencia de citología obtenida a partir de monocitos y de PNN humanos estimulados ex vivo.

Tras la información y el consentimiento de los voluntarios, se han extraído 20 ml de sangre total en 8 voluntarios sanos. La población de voluntarios sanos estaba constituida por individuos hombres y mujeres, de 25 a 60 años de edad, que no toman ningún tratamiento desde hace por lo menos 7 días, en particular ningún antibiótico ni antiinflamatorio. No presentan infecciones aparentemente en curso de evolución. La sangre se ha obtenido por punción venosa en el pliegue del codo.

Para la obtención de los monocitos:

A partir de cada muestra sanguínea (20 ml), las CMN (células mononucleadas) se han aislado gracias a una técnica de gradiente de densidad bien conocida por el experto en la materia (Lympholyte-Poly[®], laboratorio Cedarlane Tebubio[®], Le Perrey-en-Yvelines, Francia). Esta técnica permite obtener dos anillos celulares distintos, un anillo superior de CMN (linfocitos y monocitos) que fue extraído, y un anillo inferior de células polinucleadas, constituido esencialmente por polinucleares neutrófilos. Los monocitos se aislaron entonces a partir de los CMN gracias a una técnica de selección positiva por separación sobre columna magnética (MACS[®], Miltenyi biotec, Paris). Los monocitos sanguíneos se ponen después en suspensión en RPMI 1640 + suero humano al 4% + penicilina G (100U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (Valbiotech).

Para la obtención de los PNN:

A partir de cada muestra sanguínea (12 ml), la centrifugación sobre Ficol (40 minutos a 1600 rpm a +4°C) ha permitido recuperar el anillo inferior resuspendido en RPMI + suero humano (4%) + EDTA (5%). Se realizan después dos lavados en este medio (10 minutos a 1600 rpm a +4°C). Después se realiza una depleción de los eosinófilos por adición de un anticuerpo anti CD16 según una selección negativa por separación sobre columna magnética (MACS[®], Miltenyi biotec, Paris). Los PNN son después puestos en suspensión en RPMI 1640 + suero humano al 4% + penicilina G (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (Valbiotech).

Las dos poblaciones celulares así obtenidas (PNN y monocitos) se incubaron durante 90 minutos en presencia de los agonistas inmunitarios con una densidad celular de 10⁶ células/ml. El LPS se ha utilizado a una concentración final de 50 µg/ml, el PAM tiene una concentración final de 10 µg/ml, y el fMLP a una concentración final de 10⁻⁶mol/l.

Después de 90 minutos, se extrajo delicadamente un volumen de 500 µl de muestra celular (es decir 5·10⁵ células) y se depositó en un pocillo acoplado a un portaobjetos de citología según el dispositivo de confección cytospin[®]. Se realizó un ciclo de centrifugación-proyección sobre portaobjetos a 600 rpm, durante 8 minutos con una aceleración-deceleración baja. La fijación de la muestra celular proyectada sobre el portaobjetos se realizó mediante una gota de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos seguida de 3 aclarados delicados con una solución tampón de tipo PBS. Después del secado completo, se depositó una gota de 20 µl de medio de montaje ProLong[®] Gold antifade reagent recientemente descongelado sobre la muestra celular fijada. Una laminilla cubreobjetos de vidrio se depositó delicadamente después sobre la gota del medio de montaje evitando cualquier formación de burbujas de aire.

Los portaobjetos de citologías así obtenidos se observaron entonces sobre microscopio confocal de barrido láser. Para la adquisición de la señal de intensidad de fluorescencia, se utilizó la fuente láser Argón UV continua (λ = 364 nm, P = 1,3 mW), así como un fotomultiplicador (ganancia = 1250 V) en el campo de longitud de onda que va de 400 nm a 550 nm, con un pinhole abierto a 1/3 de la apertura máxima, y un objetivo X 63 de inmersión en aceite. Se aplicó una media de 4 imágenes con una resolución 1024 píxeles/1024 píxeles para un tamaño final de 246 µm/246 µm para la visualización de la imagen en I_r.

Se observa un aumento significativo de IF del 10% al 18% para los monocitos estimulados con respecto a los monocitos control. Se observa, por otra parte, una disminución significativa de I_f (de un factor 2) para los PNN estimulados con respecto a los PNN control. Parece por lo tanto que existe, tanto para los monocitos estimulados como para los PNN estimulados, una diferencia en I_f de autofluorescencia con respecto a los monocitos o PNN control. Esta oposición "PNN-monocitos" en el sentido de la variación de I_f de las células estimuladas se explica probablemente por los diferentes fundamentos de metabolismo energético celular y los medios de defensas contra el patógeno.

En lo que se refiere al protocolo de citocentrifugación (cytospin), se han ensayado varias fuerzas de rotación: 300 rpm, 600 rpm, 800 rpm, así como varios tiempos de centrifugación (6 minutos, 8 minutos, 10 minutos). La combinación de la fuerza de 600 rpm con el tiempo de 8 minutos resultó ofrecer más rendimiento y ser la más rentable en términos de tiempo de preparación de las muestras citológicas.

Se ensayaron varios protocolos de fijación de las muestras celulares, en particular el PFA al 4% y el aerosol alcohólico con etanol (Merckofix Spray, Merck art), así como una fijación a -20°C en acetona o etanol o metanol. Los mejores resultados en términos de aprovechamiento de la autofluorescencia celular se han observado con el uso del PFA al 4%.

Se han ensayado varios modos de montaje de la muestra celular entre portaobjetos y el cubreobjetos, en particular el Eukitt Mounting Medium (ProSciTech), el Fluoromount-G (SouthernBiotech), y el Prolong Gold Reagent

(Invitrogen, Molecular Probes). Los mejores resultados en términos de aprovechamiento de la autofluorescencia de las muestras celulares se han observado con el Prolong Gold Reagent.

4) Demostración del aprovechamiento de la autofluorescencia de células de LBA extraídas en un modelo murino de neumonía.

En lo referente al modelo de neumonía por estafilococos, una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM) (cepa ATCC 29213) se cultivó durante 16 horas a 37°C en un medio triptico de soja. Inmediatamente antes de la utilización, los cultivos se lavaron dos veces (centrifugados durante 10 minutos a 1000 g) y se diluyeron en un suero salino isotónico estéril para ser calibrados por espectroscopia. La concentración bacteriana se controló sistemáticamente por cultivo cuantitativo.

En lo referente al modelo de neumonía por *Pseudomonas Aeruginosa*, se ha cultivado una cepa de *Pseudomonas Aeruginosa* de tipo salvaje durante 18 horas a 37°C en medio líquido triptico de soja. Inmediatamente antes de la instilación intratraqueal, los cultivos se lavaron dos veces (centrifugados durante 10 minutos a 5000 g a 37°C) y se diluyeron en un suero isotónico estéril para ser calibrados por espectroscopia. Después de la calibración por nefelometría para obtener una concentración a $1 \cdot 10^6$ UFC/ml. El control se realiza sobre agar cetrimida (medio selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*).

Los ratones se anestesiaron por Isoflurano, y se colocaron en posición decúbito dorsal. Una aguja de alimentación enteral (calibre 24) se ha utilizado para el cateterismo de la tráquea y la inyección de 70 µl de solución bacteriana (estafilococo o *Pseudomonas Aeruginosa*). Los ratones se suspendieron entonces durante 30 segundos por los incisivos para mejorar la penetración del inóculo. El porcentaje de instilación intratraqueal alcanzó el 100%.

Después de 24 horas, inmediatamente después de la eutanasia, se realizó un lavado bronqueoalveolar, poniendo un catéter en la tráquea por vía precutánea (catéter de calibre 24). Se realizó entonces un lavado mediante 3 x 1 ml de suero fisiológico. Se realizó entonces un recuento celular sobre Mallasez. El líquido del lavado alveolar se centrifugó (10 minutos a 5000 g a 37°C) y el residuo celular se resuspendió en un suero fisiológico csp $1 \cdot 10^6$ células/ml.

Un volumen de 500 µl de muestra celular (es decir $5 \cdot 10^5$ células) se extrajo y se depositó delicadamente en un pocillo acoplado a un portaobjetos de microscopía según el dispositivo de confección cytospin[®]. Se realizó un ciclo de centrifugación-proyección sobre el portaobjetos a 600 rpm durante 8 minutos con una aceleración-deceleración baja. La fijación de la muestra celular proyectada sobre el portaobjetos se realizó por una gota de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos seguida de 3 aclarados delicados con una solución tampón de tipo PBS. Después del secado completo, se depositó una gota de 20 µl de medio de montaje ProLong[®] Gold antifade reagent recientemente descongelado sobre la muestra celular fijada. Una laminilla cubreobjetos de vidrio se depositó después delicadamente sobre la gota de medio de montaje evitando cualquier formación de burbujas de aire.

Se caracterizó la proporción de los diferentes tipos celulares PNN/macrófagos presentes en el líquido de lavado alveolar (marcado Giemsa):

	Número de células (/µl)	Macrófagos (%)	Polinucleares neutrófilos (%)
Sham	338 +/- 230	67 +/- 5 *	33 +/- 5
<i>Staphylococcus aureus</i>	343 +/- 161	7 +/- 4	93 +/- 4 *
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	255 +/- 57	20 +/- 9	80 +/- 9 *

* P < 0,05 frente a Sham

Se observa un aumento muy significativo del número de células PNN con respecto a los macrófagos en los ratones que han sido inoculados por una u otra de las soluciones bacterianas (estafilococo o *Pseudomonas Aeruginosa*). Los porcentajes de polinucleares neutrófilos observados en los animales infectados con respecto a los animales control (sham) confirman la presencia de una neumopatía bacteriana.

Los portaobjetos de muestras así obtenidos se observaron entonces sobre un microscopio confocal de barrido láser. Para la adquisición de la señal de intensidad de fluorescencia, se utilizó la fuente láser argón UV continua ($\lambda = 364$ nm, P = 1,3 mW), así como un fotomultiplicador (ganancia = 1250V) en el campo de longitud de onda que va de 400 nm a 550 nm, pinhole abierto a 1/3 de la apertura máxima, con un objetivo X 63 de inmersión en aceite. Se aplicó una media de 4 imágenes con una resolución de 1024 píxeles/1024 píxeles para un tamaño final de 246 µm/246 µm para la visualización de la imagen en I_r.

Se estudiaron 29 ratones con 8 ratones control, 9 ratones con neumonía por *Pseudomonas Aeruginosa*, y 12 ratones con neumonía por estafilococo. La intensidad de la autofluorescencia media celular disminuye para los portaobjetos procedentes de los ratones con neumonía con respecto a las células procedentes de LBA de ratones control. Las células mayoritarias (PNN) procedentes de LBA de ratones con neumonía fluorescente son menos que las procedentes de LBA de ratones control (44, 8 UA frente a 107,5 UA). Existe un factor 2 entre la intensidad media de autofluorescencia de células procedentes de LBA de ratones con neumonía y la intensidad media de

5 autofluorescencia de las células procedentes de LBA de ratones control. Estos resultados permiten discriminar unas células procedentes de LBA de ratones control y unas células procedentes de LBA de ratones que padecen neumonía; esta discriminación se basa en una diferencia de intensidad media de autofluorescencia. La observación de una variación opuesta de la señal de autofluorescencia de las células procedentes de LBA de ratones infectados con la de los monocitos en el modelo de estimulación *ex-vivo*, confirma que la mayoría de las células contenidas en los LBA de ratones infectados está constituida por PNN. Este resultado está entonces de acuerdo con la disminución de la intensidad de autofluorescencia de los PNN estimulados *ex vivo* con respecto a los PNN control no estimulados en el modelo anterior de citología de células estimuladas *ex vivo*. La diferencia en el sentido de la variación de la intensidad media de autofluorescencia entre PNN y monocitos estimulados reside probablemente en sus diferencias notables en términos de metabolismo energético y de medios de defensa contra al patógeno que conduce a su estimulación.

Referencias bibliográficas

- 15 Babior B.M. *et al.*, Blood 1984; 64:959-966
- Brun-Buisson C *et al.*, Intensive Care Med 2004;30:580-588.
- 20 E. Pilly, Maladies infectieuses et tropicales, 22^a edición, 2010
- Keneth M. Murphy, Paul Travers, y Mark Walport, Janeway's immunobiology. 7^a edición (capítulo 2, Innate Immunity).
- 25 Li BH *et al.*, World J. Gastroenterol. 2006; 24:1213-1217
- Martin GS *et al.*, N Engl J Med 2003; 348:1546-1554.
- Mayevsky A *et al.*, Am J. Physiol. Cell Physiol. 2007; 292:C615-640
- 30 Monici M., Biotechnol Annu Rev. 2005; 11:227-56.
- Palmer GM *et al.*, Photochem Photobiol 2003; 78:462-469
- 35 Pauly J.L. *et al.*, Microsc Res Tech 2005; 67:79-89
- Petty H.R. *et al.*, PNAS 2001, vol. 98, n° 6, 3145-3149

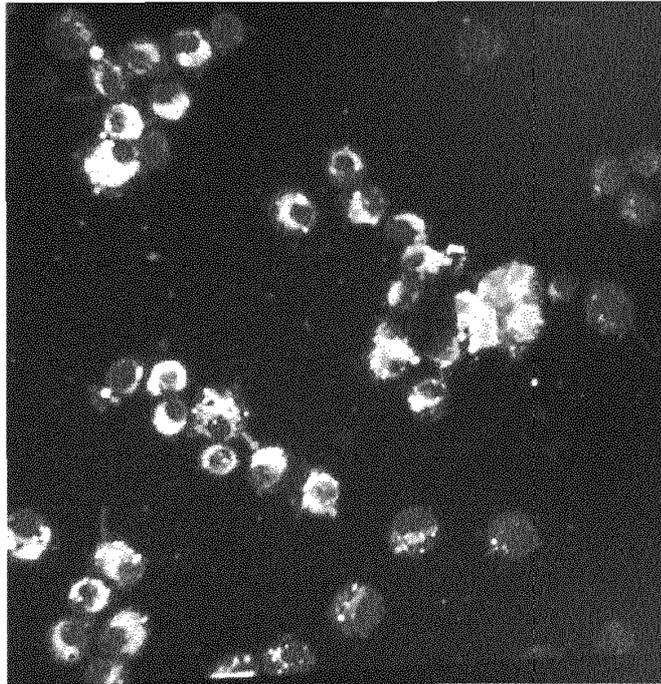
REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para diagnosticar el estado infeccioso de un individuo a partir de una muestra de glóbulos blancos procedente de una extracción biológica de dicho individuo, que comprende por lo menos las etapas siguientes:
- 10 i) medir la intensidad celular media de autofluorescencia de dicha muestra, y
- ii) comparar la intensidad medida en la etapa i) con un valor control, de manera que se determine el estado infeccioso de dicho individuo.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los glóbulos blancos de dicha muestra se seleccionan de entre los monocitos y/o los neutrófilos polinucleares.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que, cuando el estado de dicho individuo es infeccioso, dicho individuo padece una infección bacteriana, viral o fúngica, preferentemente bacteriana.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha extracción biológica es un fluido procedente de un órgano de dicho individuo.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicha extracción biológica es un fluido pulmonar, un líquido de ascitis, un fluido cefalorraquídeo, una extracción sanguínea o un fluido de cualquier otro órgano potencialmente infectado.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se mide sobre unas células en suspensión.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que la intensidad de la autofluorescencia de dichas células en suspensión se mide por citometría de flujo o por espectrofotometría.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se mide sobre unas células fijadas químicamente y colocadas en un portaobjetos compatible con la observación de la fluorescencia, preferentemente un portaobjetos de vidrio transparente.
- 35 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la intensidad de la autofluorescencia de las células de dicha muestra se mide con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.
- 40 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 8 y 9, en el que dicha muestra de células se prepara en monocapa sobre un portaobjetos de material transparente antes de la etapa i), según un procedimiento que comprende por lo menos las etapas siguientes:
- 45 a) depositar las células de dicha muestra en por lo menos un sistema de citocentrifugación,
- b) centrifugar el dispositivo obtenido en la etapa a), preferentemente a aproximadamente 600 rpm, durante aproximadamente 5 minutos, de manera que las células se proyecten sobre dicho portaobjetos,
- 50 c) fijar químicamente las células así proyectadas sobre el portaobjetos para formar un punto celular, con por lo menos una gota de paraformaldehído (PFA) al 4% aproximadamente, preferentemente durante 10 minutos aproximadamente,
- d) aclarar el punto celular anteriormente fijado, preferentemente con tampón PBS,
- 55 e) dejar secar el punto celular anteriormente aclarado,
- f) añadir sobre el punto celular anteriormente secado por lo menos una gota de un medio de montaje compatible con la observación de la fluorescencia,
- 60 g) colocar una laminilla cubreobjetos transparente, preferentemente de vidrio, sobre el punto celular procedente de la etapa f).
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que, cuando los glóbulos blancos de dicha muestra son mayoritariamente unos monocitos, el estado de dicho individuo es infeccioso si la intensidad de la autofluorescencia medida en la etapa i) es significativamente superior al valor control.
- 65 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que, cuando los glóbulos

blancos de dicha muestra son mayoritariamente unos polinucleares neutrófilos, el estado de dicho individuo es infeccioso si la intensidad de la autofluorescencia medida en la etapa i) es significativamente inferior al valor control.

Figura 1

A



B

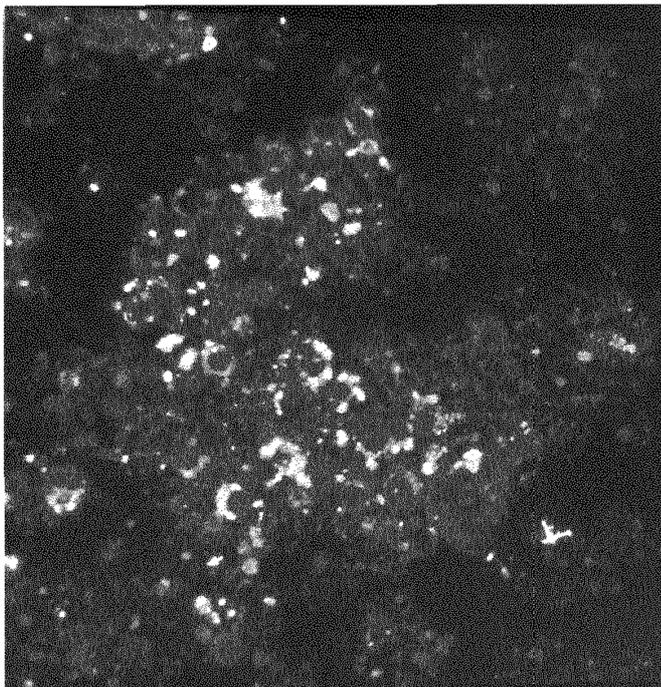


Figura 2

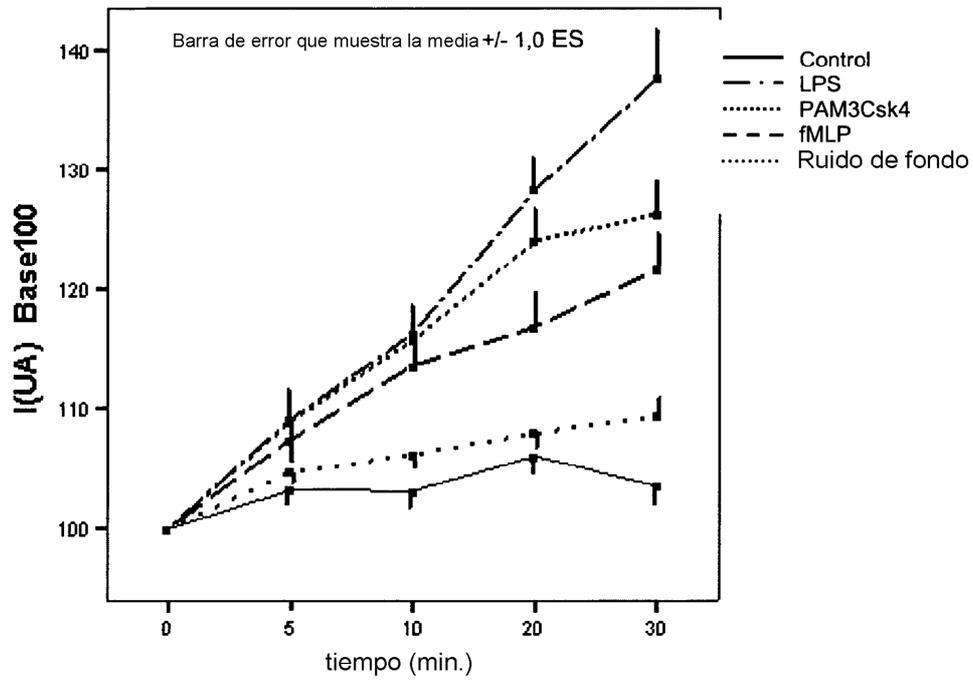


Figura 3

