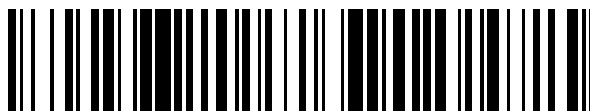


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 761**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010** **E 10724303 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015** **EP 2438447**

54 Título: **Detección de infecciones bacterianas en individuos que padecen disnea**

30 Prioridad:

**05.06.2009 EP 09162067**

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

**28.05.2015**

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)**  
**Neuendorfstrasse 25**  
**16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS y**  
**HARTMANN, OLIVER**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 536 761 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

Detección de infecciones bacterianas en individuos que padecen disnea.

5 El campo de la presente invención es el del diagnóstico y/o la predicción y/o el seguimiento de la terapia de las infecciones bacterianas en individuos que padecen disnea. Constituye un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para el diagnóstico y/o la predicción y/o el seguimiento de la terapia de las infecciones bacterianas en individuos que padecen disnea.

10 La insuficiencia cardiaca (HF) se asocia habitualmente con una alta morbilidad y mortalidad y es difícil de diagnosticar, particularmente en los departamentos de urgencias (ED) (*Cleland et al.: The EuroHeart Failure survey programme- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. Eur Heart J 2003, 24:442-63; Mosterd A., Hoes A.W.: Clinical epidemiology of heart failure. Heart 2007, 93: 1137-46*). La disnea es el síntoma principal de la mayoría de los pacientes con insuficiencia cardiaca. Un  
15 riesgo importante para estos pacientes es la presencia posible de una infección bacteriana, respectivamente. Desafortunadamente, ni la historia del paciente ni el examen físico pueden diferenciar de forma segura la disnea que se debe a la insuficiencia cardiaca de la disnea debida a otras causas, tales como enfermedades pulmonares (*Mueller C. et al.: Emergency diagnosis of congestive heart failure: impact of signs and symptoms. Can J Cardiol 2005, 21:921-4; Wang C.S. et al.: Does this dyspneic patient in the emergency department have congestive heart failure? JAMA 2005, 294:1944-56*.) Sin embargo, el diagnóstico seguro es preceptivo para seleccionar el tratamiento  
20 más apropiado.

La procalcitonina (PCT) se ha convertido en un biomarcador bien establecido para el diagnóstico de la septicemia: PCT refleja la gravedad de la infección bacteriana y se utiliza particularmente para monitorizar la progresión a  
25 septicemia de la infección, septicemia grave o choque séptico. Es posible utilizar PCT para medir la actividad de la respuesta inflamatoria sistémica, para controlar el éxito terapéutico y estimar el pronóstico (*Assicot M et al.: High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet 1993, 341:515-8; Clec'h C et al.: Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with sepsis shock. Crit Care Med 2004; 32:1166-9; Lee YJ et al.: Predictive comparisons of procalcitonin (PCT) level, arterial ketone body ratio (AKBR), APACHE III score and multiple organ dysfunction score (MODS) in systemic inflammatory response syndrome (SIRS), Yonsei Med J 2004, 45, 29-37; Meisner M.: Biomarkers of sepsis: clinically useful? Curr Opin Crit Care 2005, 11, 473-480; Wunder C et al.: Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. Inflamm Res 2004, 53, 158-163*). The increase of PCT levels in patients with sepsis correlates with mortality (*Oberhoffer M et al.: Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. Clin Chem Lab Med 1999, 37:363-368*).  
30  
35

Un número creciente de estudios consideran el papel potencial de PCT en otras enfermedades infecciosas, tales como neumonía, meningitis bacteriana y malaria (*Bugden SA, Coles C, Mills GD. The potential role of procalcitonin in the emergency department management of febrile young adults during a sustained meningococcal epidemic. Emerg Med Australas 2004, 16, 114-119; Chiwakata CB et al.: Procalcitonin as a parameter of disease severity and risk of mortality in patients with Plasmodium falciparum malaria, J Infect Dis 2001, 183, 1161-1164; Schwarz S et al.: Serum procalcitonin levels in bacterial and bacterial meningitis, Crit Care Med 2000, 28, 1828-1832*).  
40

Constituye una aspiración en la técnica predecir una infección bacteriana o septicemia que sea indetectable mediante la utilización de sólo PCT en el día de presentación. Se escogió un nivel de PCT > a 0,1 ng/ml como valor umbral para la presencia de una infección bacteriana o septicemia.  
45

Se sabe que la potenciación de concentraciones de neopterina en los fluidos corporales de pacientes, se relaciona con enfermedades en las que juega un papel la respuesta inmune mediada celularmente. El interferón-γ se produce durante la respuesta inmune y estimula la producción y liberación de neopterina. (*Fuchs D. et al.: Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. Int Arch Allergy Immunol 1993, 101:1-6*).  
50

La determinación de la neopterina refleja el estado de activación del sistema inmunológico celular durante el estado inicial y en subsiguientes estados de distintas enfermedades, representando un significado capital. La determinación de los niveles de neopterina en los fluidos corporales humanos ofrece una innovadora herramienta para la monitorización de patologías asociadas con la activación de la inmunidad mediada celularmente. Así como es de valor en las enfermedades autoinmunes y en la monitorización de la terapia inmuno estimulatoria, la determinación de la neopterina en el laboratorio es útil en el pronóstico en la infección por HIV y en el escaneo de las muestras de sangre de los donadores (*Murr C. et al.: Neopterin as a marker for immune system activation. Curr Drug Meta 2002, 3:175-87*). La neopterina constituye un marcador general para la activación del sistema inmune celular.  
55  
60

Morrison L.K. et al. (Journal of the American College of Cardiology, vol. 39, nº 2, 16 enero 2002, páginas 202-209), describe la utilización de BNP en pacientes que padecen disnea, para diferenciar entre insuficiencia cardiaca congestiva y enfermedad pulmonar. No hay evidencia de que BNP pueda utilizarse como marcador para distinguir  
65 posteriormente situaciones pulmonares, tales como infecciones bacterianas dentro del grupo de enfermedades pulmonares.

El documento WO 2008/040328 da a conocer un procedimiento para diagnosticar infecciones del tracto respiratorio o enfermedades inflamatorias pulmonares con insuficiencia cardiaca, utilizando procalcitonina y marcadores adicionales tales como CRP, BNP, NT-proBNP, pro-ET-1 o proADM.

Rainer T.H. *et al.* (The Journal of Infection, vol. 58, nº 2, febrero 2009 (2009-02), páginas 123-130), informa que una relación de CRP a neopterina puede utilizarse para diferenciar causas víricas y bacterianas de infecciones agudas del tracto respiratorio en muestras séricas de pacientes que padecían preferentemente neumonía, de la que se sabe se acompaña de disnea.

Ip *et al.* (Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, vol. 59, nº 2, 1 octubre 2007 (2007-10-01), páginas 131-136), describen que la neopterina sérica, CRP y procalcitonina puedan utilizarse para diferenciar etiologías virales de las bacterianas, en pacientes que presenten infecciones del tracto respiratorio inferior que se asocian inevitablemente con disnea. Sin embargo, no existe información respecto al valor predictivo o pronóstico de dichos marcadores.

Delogu, *et al.* (Journal of Critical Care, vol. 10, nº 2, 1995, páginas 64-71), informa respecto al valor predictivo de neopterina e IL-2 para que tenga lugar un shock en septicemia gram negativas. Algunos pacientes presentaron septicemia como resultado de neumonías que pudieron acompañarse de apnea, pero no se investigó si existía, por una parte, relación entre apnea e infección y por otra entre el valor de predicción de la neopterina e IL-2.

Constituye un objetivo de la presente invención un procedimiento *in vitro* de diagnóstico de y/o de predicción y/o de seguimiento terapéutico de infecciones bacterianas en individuos que presentan disnea, que incluye la utilización de neopterina combinada con uno o más marcadores cardiovasculares.

La presente invención se define en su más amplio sentido mediante las reivindicaciones que se adjuntan.

Especialmente preferido es dicho procedimiento *in vitro* para la predicción de infecciones bacterianas en un individuo que padezca disnea o para el pronóstico de una infección bacteriana en un individuo que padezca disnea y/o se someta a un seguimiento predictivo o de prognosis.

Un objetivo preferido de la presente invención es un procedimiento *in vitro* de predicción de infecciones bacterianas en un individuo que padezca disnea, o el pronóstico de una infección bacteriana en un individuo que padezca disnea, y/o una predicción o seguimiento de su pronóstico, que comprende la utilización de neopterina como un marcador, en combinación con uno o más marcadores cardiovasculares tal como se definen en la reivindicación 1.

Para los anteriores procedimientos, se extrae una muestra de dicho individuo para determinar los marcadores respectivos.

En los procedimientos *in vitro* relacionados con la predicción o pronóstico, dicho individuo no presenta una infección bacteriana en el momento en que la muestra se extrae de dicho individuo.

Un individuo se considera como desprovisto de una infección bacteriana si la concentración de procalcitonina en una muestra seleccionada de entre el grupo compuesto por sangre, suero y plasma, extraída de dicho individuo, es igual o inferior a 0,1 ng/ml.

Los ensayos para determinar el nivel de procalcitonina en una muestra, son bien conocidos en la técnica.

Según esta invención, se mostró sorprendentemente que la combinación de neopterina con uno o más marcadores cardiovasculares, puede potenciar considerablemente la eficiencia del diagnóstico y/o de la predicción y/o del seguimiento de la terapia de las infecciones bacterianas en individuos que padecen disnea, en comparación con el diagnóstico del estado de la técnica y/o la predicción y/o del seguimiento de la terapia de las infecciones bacterianas en dichos individuos.

La combinación de la neopterina con uno o más marcadores cardiovasculares fue especialmente eficiente en todos los procedimientos relacionados con el pronóstico y la predicción.

En una forma de realización de la invención, el procedimiento *in vitro* según la presente invención comprende la determinación del nivel de neopterina y de dicho marcador o de más marcadores cardiovasculares en una muestra extraída de dicho individuo.

En una forma de realización de la invención, el procedimiento *in vitro* según la presente invención, comprende la determinación del nivel de neopterina y de dicho marcador o más marcadores cardiovasculares, en una muestra extraída de dicho individuo con uno o más inmunoensayos.

Según la presente invención dicha muestra se selecciona del grupo constituido por una muestra de sangre, una

muestra de suero y una muestra de plasma.

En un aspecto de la invención, el marcador o los marcadores cardiovasculares, son seleccionados de entre MR-proADM, MR-pro-ANP, CT-ProET-1, CT-proAVP, BNP y NT-proBNP y de sus precursores de por lo menos 12 aminoácido) o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos.

El procedimiento *in vitro* según la presente invención puede incluir la correlación del nivel de neopterinina y del de uno o más marcadores cardiovasculares y, basándose en el resultado de la correlación, determinar si dicho paciente padece una infección bacteriana.

En una forma de realización de la invención la infección bacteriana se manifiesta en forma de neumonía.

En otra forma de realización de la invención, la infección bacteriana se manifiesta como septicemia. Se conoce bien en la técnica que un síntoma de septicemia puede consistir en la dificultad para respirar (*Bozkurt and Mann 2003, Circulation, 108, e11-e13, página 2 columna derecha, línea 5*).

En una forma de realización preferida del procedimiento *in vitro* según la invención, el valor del umbral para la neopterinina es de un nivel superior a 10 nmol/l.

En una forma de realización especialmente preferida del procedimiento *in vitro* de la invención, el valor del umbral para MR-proADM es superior a 1 nmol/l, el valor del umbral para CT-pro-AVPis es superior a 10 pmol/l, el valor del umbral para CT-proET-1 es superior a 100 pmol/l, el valor del umbral para MR-proANP es superior a 100 pmol/l, el valor del umbral para NT-proBNP es superior a 600 pg/ml, y el valor del umbral para BNP es superior a 280 pg/ml.

Expuesta además en la invención está la utilización de un ensayo para determinar el nivel de neopterinina y de uno o más marcadores cardiovasculares en una muestra, o un ensayo para la determinación del nivel de neopterinina conjuntamente con uno o más ensayos para la determinación del nivel de uno o varios marcadores cardiovasculares, para la detección de una infección bacteriana.

Otro objetivo de la invención es la utilización anteriormente establecida para detectar la infección bacteriana en un paciente que muestra disnea.

Otro objetivo de la invención es la utilización anteriormente establecida para detectar una infección bacteriana, la cual se manifiesta en forma de neumonía.

Otro objetivo de la invención es la utilización anteriormente establecida para detectar una infección bacteriana, la cual se manifiesta en forma de septicemia.

En una forma de realización preferida de la utilización anteriormente mencionada para la detección de una infección bacteriana, el valor del umbral para la neopterinina es superior a 10 nmol/l.

Uno o varios de los marcadores cardiovasculares según dichas utilizaciones, se seleccionan preferentemente de entre MR-proADM, MR-proANP, CT-Pro-ET-1, CT-proAVP, BNP y/o NT-proBNP y/o el precursor o sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos.

Preferentemente, el valor del umbral para MR-proADM es superior a 1 nmol/l, el valor del umbral para CT-proAVP es superior a 10 pmol/l, el valor del umbral para CT-proET-1 es superior a 100 pmol/l, el valor del umbral para MR-proANP es superior a 100 pmol/l, el valor del umbral para NT-proBNP es superior a 600 pg/ml, y el valor del umbral para BNP es superior a 280 pg/ml.

Tal como se muestra en la tabla 1, la combinación de neopterinina como marcador (> 10 nmol/l) con MR-proADM, CT-proET-1, CT-proAVP, MR-proANP, BNP o NT-proBNP dio lugar a una eficiencia significativamente potenciada del diagnóstico y/o de la predicción y/o del seguimiento de la terapia de las infecciones bacterianas en individuos que padecen disnea, con respecto al cociente de posibilidades (véase tabla 1).

La combinación de neopterinina como marcador con uno o más marcadores seleccionados de entre MR-proADM, MR-proANP, CT-proET-1, CT-proAVP, BNP y NT-proBNP y sus fragmentos y precursores de por lo menos 12 aminoácidos y sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos, es especialmente eficiente en los procedimientos según la presente invención, que se relacionan con la predicción y pronóstico (véase tabla 2). Los valores tal como se muestran en la tabla 2 se basan en los mismos datos brutos que los valores que se muestran en la tabla 1. Los umbrales escogidos según la tabla 2 dieron lugar a un valor predictivo negativo esencialmente idéntico para todos los marcadores y combinaciones de marcadores, mientras que el valor predictivo positivo aumentó significativamente para la combinación de neopterinina con MR-proADM, MR-proANP, CT-proET-1, CT-proAVP, BNP o NT-proBNP, comparado con la neopterinina sola. Así, el valor predictivo positivo obtenido de acuerdo con esto, indica el poder pronóstico del marcador y de la combinación de éste. Como puede verse en la tabla 2, el poder predictivo de las combinaciones del marcador es más alto que para la neopterinina como único marcador. El poder

predictivo de la combinación del marcador puede también colegirse de la tabla 1, cuando se considera el cociente de posibilidades o el cociente de posibilidades relativo. La sensibilidad calculada y la especificidad según la tabla 1 no es muy indicativa del poder predictivo, pues ambas, sensibilidad y especificidad, son variables.

5 El ensayo diagnóstico o ensayo o inmunoensayo puede ser de cualquier tipo que se aplique en el campo diagnóstico, incluyendo pero no limitándose a los procedimientos de ensayo basados en

- reacciones enzimáticas
- luminiscencia
- 10 - fluorescencia
- sustancias radioquímicas

Los procedimientos preferidos de detección comprenden ensayos de tiras reactivas, radioinmunoensayos, inmunoensayo quimioluminiscente y fluorescente ensayo de inmunotransferencia, Enzimoimmunoanálisis de absorción (ELISA) micromatrices multigénicas microsféricas, basadas en Luminex, y ensayo micromatriz multigénico proteico. Los tipos de ensayo pueden además basarse en placas de microtitulación, en micromatrices multigénicas, en microesferas, en las que las proteínas de los biomarcadores pueden unirse a la superficie o estar disueltas.

Los ensayos pueden ser homogéneos o heterogéneos, competitivos y no competitivos. En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo es en forma de tipo "bocadillo", que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula que va a detectarse o/y a cuantificarse, se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, por ejemplo, una microesfera, una superficie de un pocillo o de otro contenedor, una multimatriz multigénica o una tira reactiva, y el segundo anticuerpo es uno que está marcado, por ejemplo, con colorante, con un radioisótopo, o una mitad reactiva o catalíticamente activa. La cantidad de anticuerpo marcado que se une al analito se mide entonces mediante un procedimiento adecuado. La composición general y los procedimientos implicados con los "ensayos tipo bocadillo" están bien establecidos y conocidos por el experto en la técnica (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3rd ed. (May 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C *et al.*, Curr Opin Chem Biol. 2006 Feb; 10(1):4-10. PMID:16376134. En el contexto de esta invención, las moléculas de captura son moléculas que pueden utilizarse para unir moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, el o los péptidos cardiovasculares de una muestra. Las moléculas de captura deben, por tanto, tener la forma adecuada, tanto espacialmente como en términos de características superficiales, tales como carga superficial, hidrofobicidad, hidrofiliidad presencia o ausencia de donadores lewis y/o aceptores, para unirse específicamente a las moléculas diana o a las de interés. Así, la unión puede medirse, por ejemplo, mediante interacciones iónicas, de van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, de unión hidrofóbica o de hidrógeno, o una combinación de dos o más de las interacciones anteriormente mencionadas entre las moléculas de captura y las moléculas diana o las moléculas de interés. En el contexto de esta invención las moléculas de captura pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo constituido por una molécula de ácido nucleico, una de un hidrato de carbono, una PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Preferentemente, las moléculas de captura son anticuerpos que incluyen sus fragmentos con afinidad suficiente para una diana o molécula de interés, e incluyendo anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos recombinantes, así como derivados modificados bioquímicamente y/o químicamente, de dichos anticuerpos, o fragmentos derivados de la cadena variable con una longitud de por lo menos 12 de sus aminoácidos.

45 Una muestra según el significado de la invención consiste en sangre, suero o plasma. La muestra se recoge de un paciente, o se somete a diagnóstico según la invención.

Cuando es apropiado, la muestra puede que necesite homogenizarse, o extraerse con un disolvente, antes de utilizarla en esta invención para obtener una muestra líquida. Esta puede entonces convertirse en una solución o en una suspensión.

Las muestras líquidas pueden someterse a uno o varios tratamientos, antes de utilizarlas en esta invención. Dichos pretratamientos incluye, pero no se limitan, a dilución, filtración, centrifugación, concentración, sedimentación, precipitación, diálisis.

Los pretratamientos pueden incluir asimismo añadir sustancias químicas o bioquímicas a la solución, tales como ácidos, bases, tampones, sales, disolventes, colorantes reactivos, detergentes, emulsificantes, quelantes.

Por "pacientes" o "individuos", según significan en la invención, se entienden todas las personas, tanto si muestran o no cambios patológicos, si no se establece lo contrario. Según la invención, cualquier muestra recogida de células, tejidos, órganos o similares, puede pertenecer a un paciente que vaya a diagnosticarse. En una forma de realización preferida, el paciente según la invención es un ser humano que padece apnea.

En la presente invención, el término predicción, se refiere a un pronóstico de cómo evolucionará la situación médica de un individuo (por ejemplo, de un paciente). Esto puede incluir una estimación de la posibilidad de su recuperación, o del advenimiento de una circunstancia adversa para dicho paciente.

La sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica y/o pronóstica, depende no sólo estrictamente de la "cualidad" analítica de la prueba, sino también de la definición de lo que constituye un resultado que no sea normal. En la práctica, las curvas Operacionales Características del Receptor (curvas ROC) se calculan típicamente graficando el valor de una variable respecto a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" (es decir, aparentemente saludables) y poblaciones "enfermas" (es decir, de pacientes que muestran infecciones bacterianas). Para cualquier marcador particular, una distribución de los niveles del marcador para individuos con y sin patologías. Se solaparán de forma semejante. Bajo tales condiciones, una prueba no distingue absolutamente entre normalidad y enfermedad con una seguridad del 100%, y el área de solapamiento indica si la prueba no puede distinguir entre normalidad y enfermedad. Se selecciona un umbral, por encima del cual (o por debajo del cual, dependiendo de cómo un marcador cambia con la patología), la prueba se considere anormal y por debajo del cual, la prueba se considere normal. El área bajo la curva ROC mide la probabilidad de que la medición percibida permitirá corregir la identificación de una condición. Las curvas ROC pueden utilizarse incluso cuando los resultados de la prueba no dan necesariamente un número seguro. Siempre que se puedan ordenar resultados, se puede crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de una prueba sobre muestras patológicas podrían ordenarse según un grado (por ejemplo 1 = bajo, 2 = normal, 3 = alto). Este ordenamiento puede correlacionarse con los resultados en la población "normal", creándose una curva ROC. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica (*Hanley et al. 1982. Radiology 143: 29-36*). Preferentemente, se selecciona un límite para proporcionar un área de la curva ROC superior a 0,5, aproximadamente, más superior, preferentemente, que alrededor de 0,7, todavía superior, preferentemente, aproximadamente, a 0,8, incluso superior, preferentemente a 0,85, y muy superior, preferentemente, a 0,9, aproximadamente. El término "aproximadamente", en este contexto, se refiere a +/- 5% de una medición dada.

El eje horizontal de la curva ROC representa (1-especificidad) que aumenta con la proporción de positivos falsos. El eje vertical de la curva representa sensibilidad, que aumenta con la proporción de positivos verdaderos. Así, para un umbral particular seleccionado, puede determinarse el valor de (1-especificidad), pudiéndose obtener una sensibilidad correspondiente. El área bajo la curva ROC mide la probabilidad de que el nivel del marcador medido permitirá la correcta identificación de una patología o condición. Así, el área bajo la curva ROC, puede utilizarse para determinar la efectividad de la prueba.

El cociente de posibilidad es una medida del tamaño del efecto, que describe la fuerza de asociación o de no-independencia entre dos valores de datos binarios, (por ejemplo, el cociente de posibilidad de un evento que tenga lugar en el grupo de prueba negativo con respecto al cociente que ocurra en el grupo de prueba positivo).

El valor predictor positivo (PPV), o porcentaje de precisión, es la proporción de pacientes con resultados positivos de la prueba que les ha diagnosticado y predicho correctamente. Refleja la probabilidad de que una prueba positiva refleje la situación subyacente que se está ensayando. El valor predictivo negativo (NPV) es la proporción de pacientes con resultados negativos de la prueba que les ha diagnosticado y predicho correctamente.

La exactitud total es el porcentaje de todos los pacientes que se clasifican correctamente con la prueba.

El término "marcadores neurohumorales" se utiliza para hormonas y péptidos, incluyendo sus precursores y sus fragmentos que influyen sistemas neuroendocrinos que incluyen pero no se limitan a encefalinas, taquiquininas, endorfinas, dimorfinas, oxitocinas, vasopresina, adrenocorticotropina, colecistoquinina, renina, angiotensina, polipéptido intestinal vasoactivo, neuropéptido Y, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, calcitonina, somatostatina, bombesina, neurotensina, hormona liberadora de la tiotropina, hormona liberadora de la gonadotropina, catecolaminas (por ejemplo norepinefrina, epinefrina, dopamina). El término "marcadores neurohumorales" incluye todos sus precursores, sus fragmentos y los fragmentos de dichos precursores.

El término "marcador cardiovascular" se define como un marcador asociado con el diagnóstico y/o la prognosis de patologías cardiovasculares, tales como mioglobina, troponinas T(cTnT) y I (cTnI), creatinquinasa MB (CK-MB), FABP, GDF-15, ST-2, procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (CRP), proAdrenomedulina y sus fragmentos, que incluyen la pro-adrenomedulina mesoregional, MR-proADM, Adrenomedulina, PAMP, proAdrenomedulina C-terminal (CT-proADM), proEndotelina-1 y sus fragmentos incluyendo la pro-endotelina-1 C-terminal (CT-proET-1), la gran Endotelina-1, Endotelina-1, NT-proEndotelina-1, proANP y sus fragmentos, incluyendo el péptido natriurético preauricular mesoregional, (MR-proANP), proANP N-terminal (NT-proANP), ANP, proVasopresina y sus fragmentos, incluyendo el péptido pro-arginina vasopresina C-terminal (CT-proAVP), Vasopresina, Neurofina II, proBNP y sus fragmentos, incluyendo BNP y proBNPN terminal (NT-proBNP). El término "marcador cardiovascular" incluye todos sus precursores, sus fragmentos y los fragmentos de dichos precursores.

Un marcador puede atribuirse a ambos grupos, puede consistir en uno neurohumoral y en otro cardiovascular, en el caso de que este marcador influencia los sistemas neuroendocrinos y se asocie con el diagnóstico y/o pronóstico de las enfermedades cardiovasculares.

El término "citoquinas" se define como una proteína que es secretada por células específicas del sistema inmune, que ejerce funciones inmunomoduladoras, que incluyen linfoquinas, interleucinas y quimioquinas, seleccionadas pero que no se limitan a IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alfa, IFN-gama y IL-1 beta.

### Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 7 muestran las graficaciones Características Operacionales Receptoras (ROC), para la neopterina y la neopterina en combinación con otros marcadores. La proporción de positivos verdaderos corresponde a la sensibilidad, mientras que la proporción de positivos corresponde a la expresión "especificidad".

Figura 1: graficación ROC para la Neopterina. Área bajo la curva (AUC)=0,625 ( $p<0,05$ ).

Figura 2: Graficación ROC para la Neopterina más (CT-proAVP), AUC=0,701 ( $p<0,05$ ).

Figura 3: Graficación ROC para Neopterina más MR-proANP, AUC=0,647 ( $p<0,05$ ).

Figura 4: Graficación ROC para la Neopterina más MR-proADM. AUC=0,660 ( $p<0,05$ ).

Figura 5: Graficación ROC, para la Neopterina más CT-proET-1. AUC=0,668 ( $p<0,05$ ).

Figura 6: Graficación ROC para la Neopterina más BNP. AUC=0,640 ( $p<0,05$ ).

Figura 7: Graficación ROC para la Neopterina más NT-proBNP. AUC=0,646 ( $p<0,05$ ).

### Ejemplos

964 pacientes que se presentaron en los Departamentos de Urgencias con síntomas de disnea, fueron hospitalizados a continuación, principalmente debido a neumonías e insuficiencia cardíaca congestiva. Tras su presentación en Urgencias, se tomó una primera muestra sanguínea, y durante la hospitalización, se obtuvieron posteriormente de una a tres muestras.

La medición de PCT se utilizó para diagnosticar una infección bacteriana con un valor umbral de 0,1 ng/ml.

De 964 pacientes que se presentaron en Urgencias con síntomas de disnea, 428 no desarrollaron una infección bacteriana (grupo A) desde su presentación en Urgencias hasta su alta hospitalaria, pues todos los valores PCT que se obtuvieron a lo largo del tiempo, fueron inferiores a  $<0,1$  ng/ml. En 416 casos (77,6%, grupo B), de los restantes 536, la infección se pudo detectar ya midiendo el PCT después de la presentación (un nivel superior a 0,1 ng/ml PCT). Los 120 pacientes restantes (22,4%, grupo C) fuera del grupo de los 536 pacientes, presentaba niveles bajos de PCT después de la presentación ( $< 0,1$  ng/ml PCT) y PCT superiores a 0,1 ng/ml por lo menos en un plazo de tiempo de medición del seguimiento (día 1, día 3, día 5, en el alta hospitalaria), definiéndose entonces por tanto como pacientes que desarrollaron una infección bacteriana.

La neopterina es un marcador no específico para la activación inmunitaria. El nivel de neopterina, medido a la presentación en Urgencias, se incrementó en 60% de los pacientes del grupo C (superior a 10 nmol/l). Idéntico aumento, sin embargo, lleva a diversos resultados positivos falsos en la predicción de infecciones en el grupo A de pacientes (42%/176 falsos positivos).

Sorprendentemente, se ha mostrado que una combinación de neopterina como marcador, con un valor umbral de  $\geq 10$  nmol/l, junto con otros marcadores que se midieron en la presentación al departamento de Urgencias, y se seleccionaron de entre pro-Adrenomedulina (MR-proADM) regional, pro-endotelina 1 (CT-proET-1) C-terminal, pro-vasopresina (CT-proAVP) C-terminal, péptido natriurético pro-auricular regional, péptido natriurético del tipo B (BNP) o péptido natriurético tipo pro B N-terminal (NT-proBNP) produjo un aumento importante de la eficiencia de la predicción de la infección, con respecto al cociente de posibilidades, el valor predictivo positivo (PPV) y la exactitud total (véase Tabla 1 y 2).

Tabla 1

| Modelo                                          | Sensibilidad | Especificidad | Infección bacteriana encontrada en el grupo C (n=120) | Resultados positivos falsos en el grupo A (n=428) | Cociente de posibilidades | Eficiencia relativa (cociente posibilidades) |
|-------------------------------------------------|--------------|---------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|
| Neopterina >10 nmol/l                           | 60,5%        | 58,9%         | 73                                                    | 176                                               | 2,2                       | 100%                                         |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>MR-proADM >1 nmol/l   | 48,3%        | 79,2%         | 58                                                    | 89                                                | 3,6                       | 164%                                         |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>CT-proAVP >10 pmol/l  | 52,1%        | 75,5%         | 63                                                    | 105                                               | 3,9                       | 177%                                         |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>CT-proET-1 >100pmol/l | 47,9%        | 79,9%         | 57                                                    | 86                                                | 3,9                       | 177%                                         |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>MR-proANP >100pmol/l  | 52,9%        | 69,1%         | 63                                                    | 132                                               | 2,7                       | 123%                                         |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>NT-proBNP >600pmol/l  | 51,3%        | 71,7%         | 61                                                    | 121                                               | 3,0                       | 136%                                         |
| Neopterina >10,<br>BNP >280pg/ml                | 43,7%        | 79,9%         | 52                                                    | 86                                                | 3,3                       | 150%                                         |
|                                                 |              |               |                                                       |                                                   |                           | global<br>p < 0,05                           |

5 Tabla 2

| Modelo                                          | Positivo verdadero | Positivo falso | Negativo verdadero | Exactitud total | Valor predictor positivo | Valor predictivo negativo |
|-------------------------------------------------|--------------------|----------------|--------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|
| Neopterina >10 nmol/l                           | 73                 | 176            | 252                | 59%             | 29%                      | 84%                       |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>MR-proADM >1 nmol/l   | 58                 | 89             | 339                | 72%             | 39%                      | 85%                       |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>CT-proAVP >10 pmol/l  | 63                 | 105            | 323                | 70%             | 38%                      | 85%                       |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>CT-proET-1 >100pmol/l | 57                 | 86             | 342                | 73%             | 40%                      | 84%                       |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>MR-proANP >100pmol/l  | 63                 | 132            | 296                | 66%             | 32%                      | 84%                       |
| Neopterina >10 nmol/l,<br>NT-proBNP >600pmol/l  | 61                 | 121            | 307                | 67%             | 34%                      | 84%                       |
| Neopterina >10,<br>BNP >280pg/ml                | 52                 | 86             | 342                | 72%             | 38%                      | 83%                       |

# REIVINDICACIONES

1. Utilización de neopterinina como marcador en combinación con uno o más marcadores cardiovasculares, siendo dicho uno o más marcadores cardiovasculares seleccionados de entre MR-proADM, MR-proANP, CT-Pro-ET-1, CT-proAVP, BNP y/o NT-proBNP y/o sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos y sus precursores o fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos en un procedimiento *in vitro* de predicción de infecciones bacterianas en un individuo que padece disnea, o de diagnóstico de una infección bacteriana en un individuo que padece disnea y/o el seguimiento de predicción o diagnóstico de la misma, siendo la concentración de procalcitonina en una muestra seleccionada de entre el grupo constituido por sangre, suero y plasma, extraída de dicho individuo igual o menor que 0,1 ng/ml.
2. Utilización de neopterinina según la reivindicación 1, en la que una muestra es extraída de dicho individuo.
3. Utilización de neopterinina según la reivindicación 1 o 2, que comprende la determinación del nivel de neopterinina y de dicho uno o más marcadores cardiovasculares en una muestra extraída de dicho individuo.
4. Utilización de neopterinina según la reivindicación 1, 2 o 3, que comprende la determinación del nivel de neopterinina y de dicho uno o más marcadores cardiovasculares en una muestra extraída de dicho individuo con uno o más inmunoensayos.
5. Utilización de la neopterinina según la reivindicación 2, 3 o 4, en la que dicha muestra es seleccionada de entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra sérica y una muestra de plasma.
6. Utilización de neopterinina según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que dicho individuo no presenta una infección bacteriana en el momento en que la muestra es extraída de dicho individuo.
7. Utilización de neopterinina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la infección bacteriana se manifiesta en forma de neumonía.
8. Utilización de neopterinina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la infección bacteriana se manifiesta en forma de septicemia.
9. Utilización de neopterinina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el valor umbral para la neopterinina es de un nivel >10 nmol/l.
10. Utilización de neopterinina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el valor umbral para MR-proADM es >1 nmol/l, el valor umbral para CT-proAVP es >10 pmol/l, el valor umbral para CT-proET1 es >100 pmol/l, el valor umbral para MR-proANP es >100 pmol/l, el valor umbral para NT-proBNP es >600 pg/ml, y el valor umbral para BNP es >280 pg/ml.

Figura 1

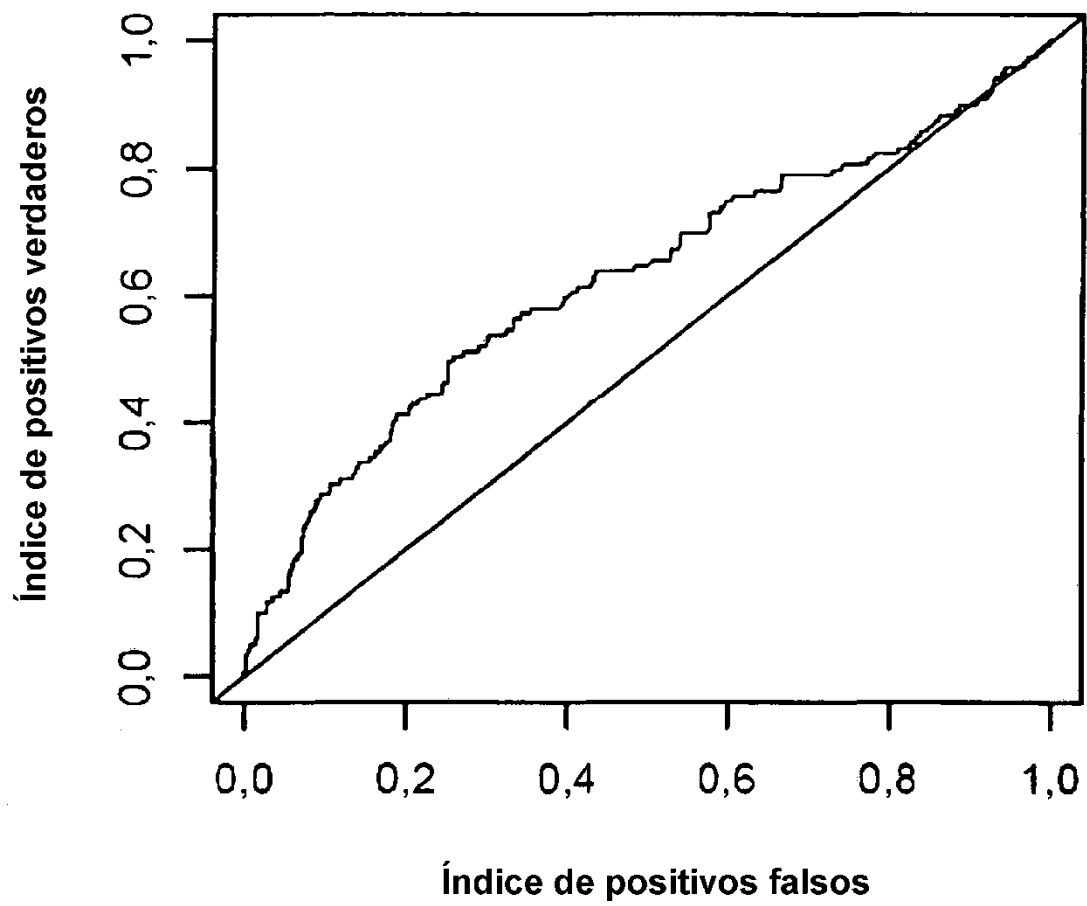


Figura 2

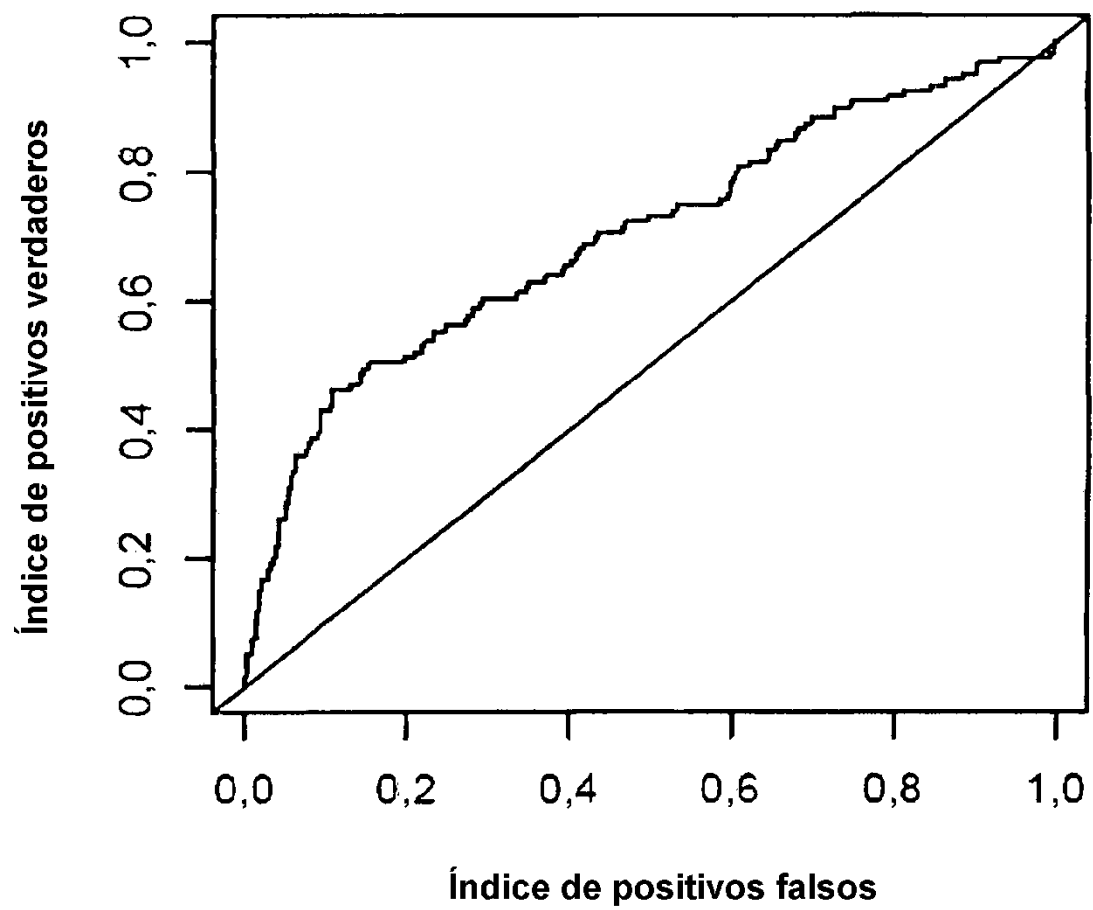


Figura 3

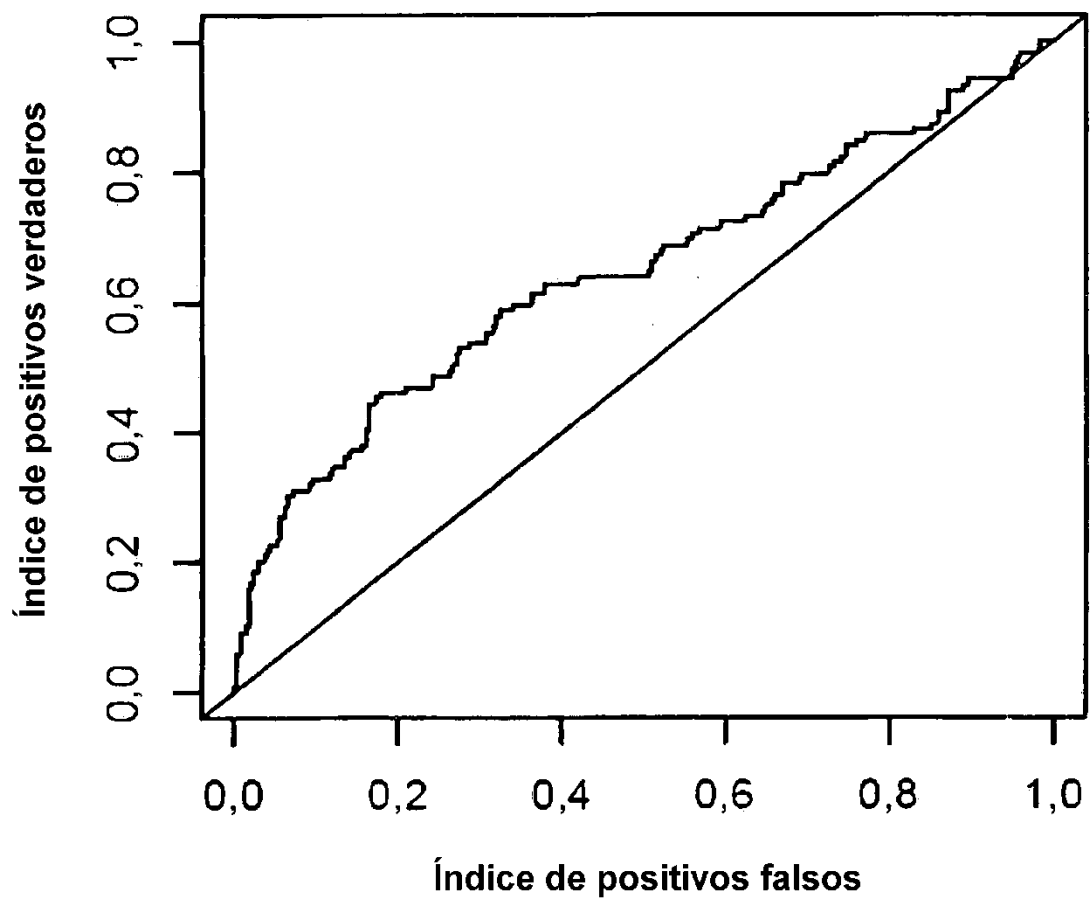


Figura 4

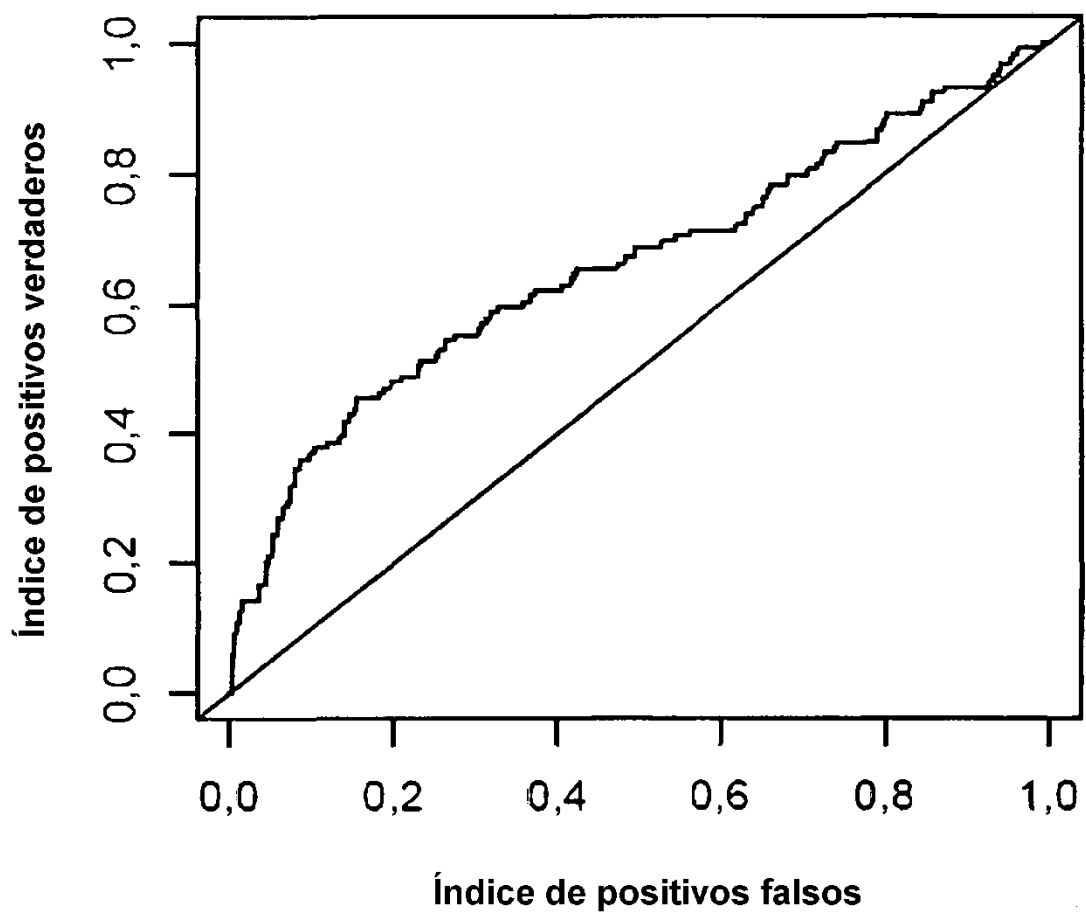


Figura 5

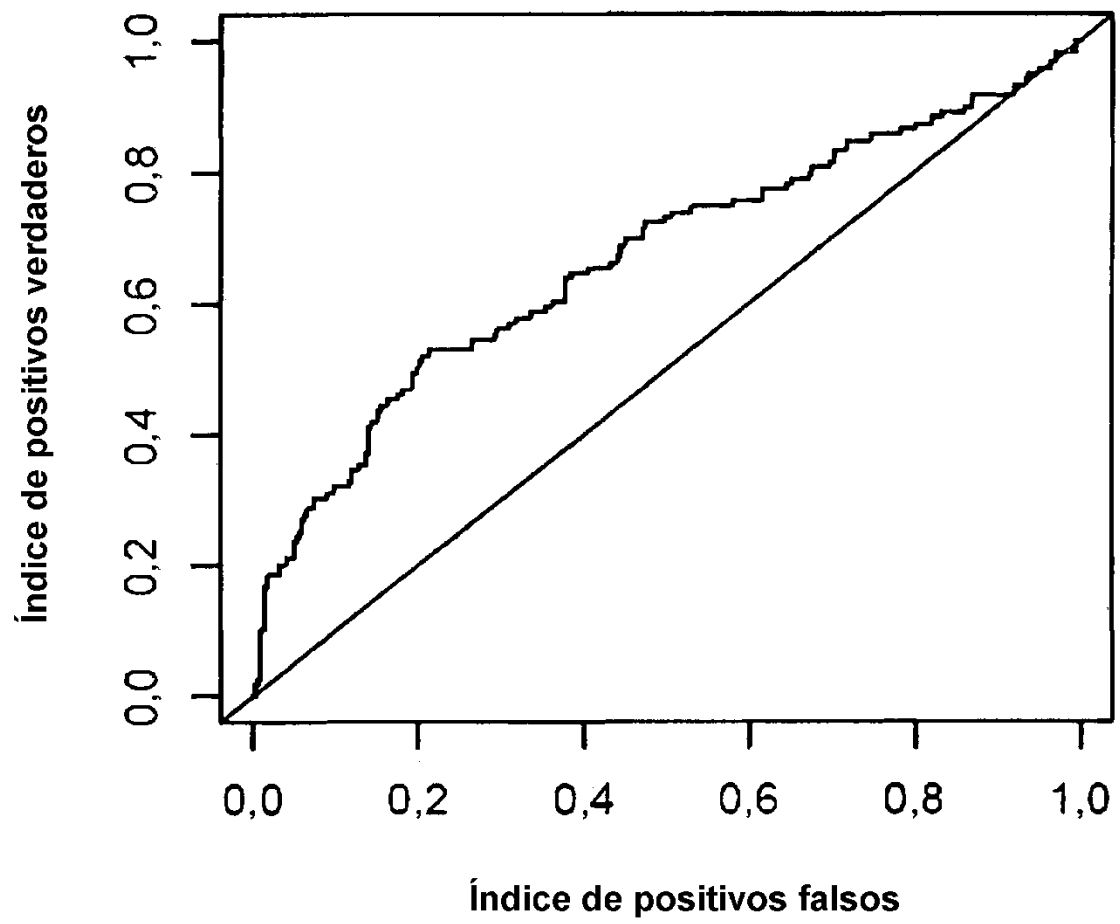


Figura 6

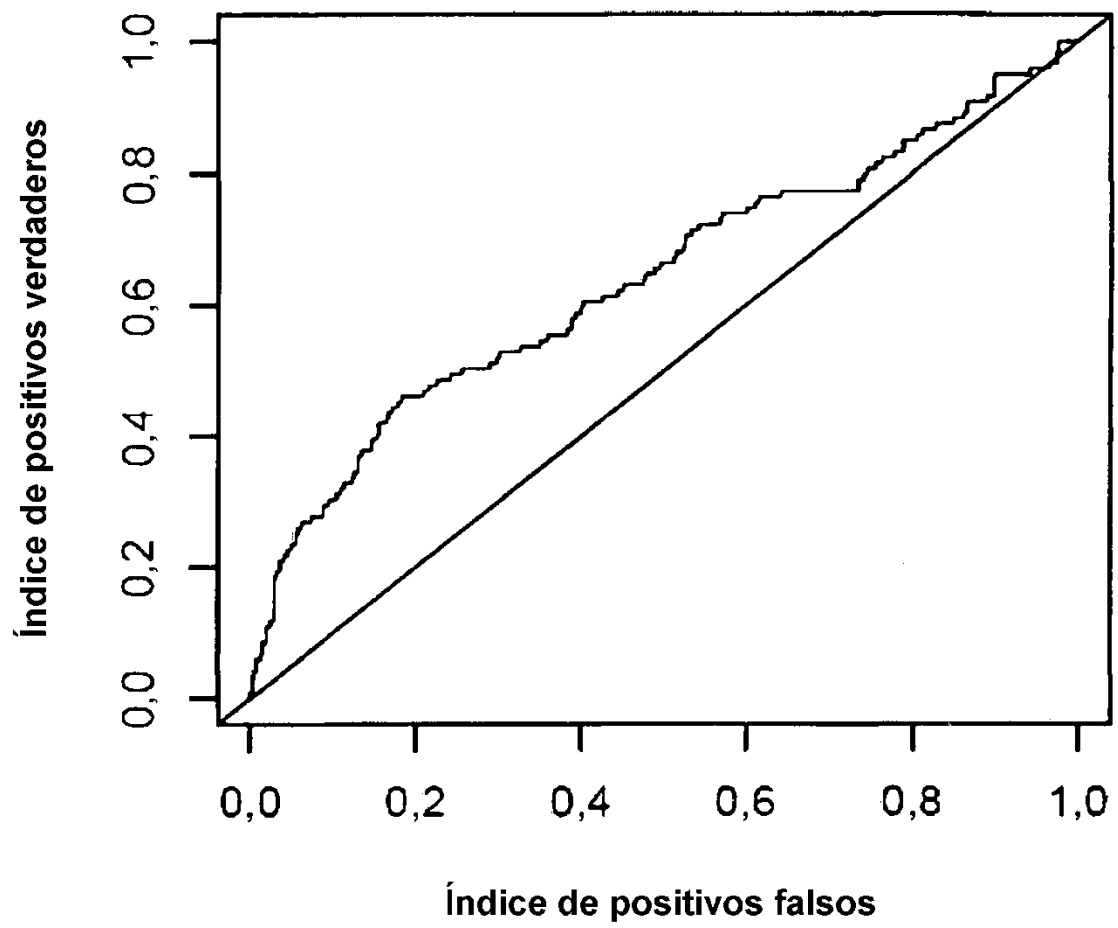


Figura 7

