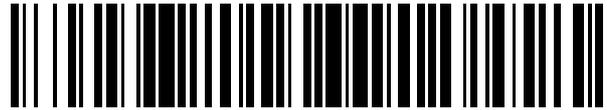


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 891**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 11706838 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2545379**

54 Título: **Procalcitonina para el diagnóstico de infecciones bacterianas y guía de tratamiento antibiótico en pacientes con síntomas inespecíficos**

30 Prioridad:

**08.03.2010 EP 10002363**

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

**29.01.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STRUCK, JOACHIM;  
BINGISSER, ROLAND;  
NICKEL, CHRISTIAN;  
HARTMANN, OLIVER y  
GIERSDORF, SVEN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 557 891 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

Procalcitonina para el diagnóstico de infecciones bacterianas y guía de tratamiento antibiótico en pacientes con síntomas inespecíficos.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico clínico. En particular, la presente invención se refiere a la determinación de la procalcitonina (PCT) en una muestra derivada de un líquido corporal de un sujeto con síntomas inespecíficos.

**Antecedentes de la invención**

Los pacientes que se presentan con síntomas inespecíficos (QNE) son una población bien conocida aunque poco definida. Se observan con frecuencia, por ejemplo, en los servicios de urgencias (SU). Los individuos afectados con frecuencia se quejan de "no sentirse bien", "sentirse débil", "sentirse exhausto", "sentirse cansado o somnoliento", de sentirse "mareado", se quejan de no poder realizar sus actividades diarias habituales, de falta de apetito (van Bokhoven *et al.*, J. Clin. Epidemiol. 61:318-22, 2008). Algunos pacientes no consiguen recordar el motivo por el que han sido enviados al SU. Durante el cuidado a los pacientes con QNE, los médicos con SU se enfrentan a un diagnóstico diferencial amplio, desde una atención domiciliaria insuficiente a condiciones agudas potencialmente letales (Gordon, Geriatrics 41(4):75-80, 1986). Los pacientes con QNE son los más difíciles para el médico de urgencias (Chew y Birnbaumer, Emerg. Med. Clin. North Am. 17(1):265-78, 1999). Además, el cuadro clínico con frecuencia se ve confundido por factores tales como comorbilidades, polifarmacia o un estado mental alterado.

Vanapee *et al.* han demostrado que hasta 20% de los individuos de más edad que se presentan en el SU no presentan síntomas específicos (Vanpee *et al.*, Eur. J. Emerg. Med. 8(4):301-4, 2001). Además, el 50% de los individuos de más edad sin síntomas específicos sufren un problema médico agudo (Rutschmann *et al.*, Swiss Med. Wkly 135(9-10):145-50, 2005).

La procalcitonina (PCT) se ha convertido en un biomarcador bien establecido para el diagnóstico de sepsis. La PCT refleja la gravedad de una infección bacteriana y se utiliza en particular para realizar un seguimiento de la progresión de la infección a sepsis, sepsis severa o choque séptico. Resulta posible utilizar la PCT para medir la actividad de la respuesta inflamatoria sistémica asociada a infección, para controlar el éxito de la terapia antibacteriana y para estimar el pronóstico (Assicot *et al.*, Lancet 341:515-8, 1993; Clec'h C. *et al.*, Crit. Care Med. 32:1166-9, 2004; Lee *et al.*, Yonsei Med. J. 45:29-37, 2004; Meisner *et al.*, Curr. Opin. Crit. Care 11:473-480, 2005; Wunder *et al.*, Inflamm. Res. 53:158-163, 2004). El incremento de los niveles de PCT en los pacientes con sepsis se correlaciona con la mortalidad (Oberhoffer *et al.*, Clin. Chem. Lab. Med. 37:363-368, 1999).

La PCT ya ha sido utilizada para la guía en la terapia antibiótica en pacientes con síntomas de infección (por ejemplo falta de aliento, fiebre, etc.). En los pacientes que se presentan en el SU con síntomas de infecciones del tracto respiratorio inferior, se midió la PCT y sólo los pacientes con concentraciones de PCT >0,25 ng/l o >0,5 ng/ml fueron tratados con antibióticos (Christ-Crain *et al.*, Lancet 363:600-7, 2004). En pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) el tratamiento antibiótico se basó en concentraciones séricas de PCT (firmemente desaconsejado a concentraciones de PCT <0,1 ng/ml; desaconsejado a concentraciones de PCT <0,25 ng/ml; aconsejado a concentraciones de PCT >0,25 ng/ml y fuertemente aconsejado a concentraciones de PCT >0,5 ng/ml) (Christ-Crain *et al.*, Am. J. Resp. Crit. Care Med. 174:84-93, 2006). La guía de la PCT redujo sustancialmente el uso de antibióticos en la NAC sin deterioro del resultado en el paciente. De manera similar, la terapia guiada por PCT utilizando los mismos umbrales de decisión indicados anteriormente también redujo marcadamente el uso de antibióticos para las infecciones agudas del tracto respiratorio en la atención primaria sin comprometer el resultado en el paciente (Briel *et al.*, Arch. Intern. Med. 168:2000-7, 2008; Burkhardt *et al.*, Eur. Resp. J. Express; doi: 10.1183/09031936.00163309).

Summah Hansa *et al.* (Mediators in Inflammation, vol. 2009) describe el papel de la PCT como marcador de la neumonía. El documento WO 2009/019230 describe la utilización de PCT como marcador en el diagnóstico de una infección bacteriana. Briel M. *et al.* (BMC Family Practice, 2005) dan a conocer la utilización de la PCT como marcador de las infecciones agudas del tracto respiratorio. Robinson *et al.* describe la utilización de PCT como marcador de sepsis neonatal.

La utilización de la medición de PCT para el diagnóstico de infecciones bacterianas prevalentes hasta hoy se había limitado a pacientes que, debido a los síntomas con los que se presentaban, ya se sospechaba que sufrían una infección bacteriana. Todavía sigue sin estar claro en absoluto si dicha utilización de PCT podría resultar posible también para pacientes que se presentan con síntomas inespecíficos, que no apuntan directamente a una infección bacteriana como posible motivo para los síntomas. En este tipo de paciente, se desconoce la prevalencia de las infecciones bacterianas, y podría ser relativamente baja. Es una gran dificultad y en absoluto evidente que un biomarcador tal como PCT pueda identificar en dicho grupo de pacientes aquellos con infecciones bacterianas con una sensibilidad y especificidad significativas, ya que los demás pacientes sin infección bacteriana son muchos y sin

duda se encuentran enfermos y podrían encontrarse muy enfermos. Hasta el momento la determinación de la PCT se ha llevado a cabo en pacientes que se sospecha que presentan una infección bacteriana debido a que dichos pacientes mostraban síntomas o se presentaban con síntomas que apuntaban a una infección bacteriana. En ningún caso se ha puesto en práctica la medición del nivel de PCT con la intención de diagnosticar una infección bacteriana prevalente en un paciente con síntomas inespecíficos.

Un método diagnóstico para determinar la etiología de los procesos inflamatorios mediante la determinación de la concentración de la PCT y para establecer la presencia o la ausencia del péptido sea la inflamación de etiología infecciosa o no infecciosa se describe en la patente EP nº 0 80 702 B1.

Inesperadamente se ha descubierto que la medición de los niveles de procalcitonina en una muestra de líquido corporal de un paciente que se presenta con síntomas inespecíficos podría utilizarse para la guía al diagnóstico y tratamiento de la infección bacteriana en estos pacientes.

### Sumario de la invención

La invención se refiere a un método para diagnosticar una infección bacteriana en un paciente que se presenta en el servicio de urgencias con síntomas inespecíficos. El método se define en las reivindicaciones adjuntas.

### Descripción de los dibujos

figura 1: concentraciones de PCT (en el momento de la admisión) de pacientes que se presentan en el SU con síntomas inespecíficos, con y sin infección.

figura 2: gráfico de ROC (por sus siglas en inglés, característica operativa del receptor) para el diagnóstico de infecciones bacterianas en pacientes que se presentan en el SU con síntomas inespecíficos.

figura 3: identificación de pacientes con síntomas inespecíficos en el estudio BANC.

### Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un método para diagnosticar o identificar una infección bacteriana en un paciente que se presenta con síntomas inespecíficos. El método se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una forma de realización de la invención la infección bacteriana es asintomática (por ejemplo una infección bacteriana que todavía no ha mostrado síntomas clínicos pero que se encuentra presente) en un paciente que se presenta con síntomas inespecíficos.

Los síntomas inespecíficos no se restringen al grupo sino que pueden seleccionarse de entre el grupo que comprende síntomas de "no sentirse bien", "sentirse débil", "sentirse exhausto", "sentirse cansado o somnoliento", sentirse "mareado", presentar falta de apetito o simplemente una queja de ser incapaz de realizar las actividades cotidianas o pacientes que no consiguen recordar por qué han sido enviados al SU.

Un síntoma específico habitualmente proporciona información clave y permite generar un diagnóstico de trabajo o seguir un protocolo diagnóstico predefinido. Los síntomas específicos se encuentran bien identificados como tales en la literatura y con frecuencia se aplican protocolos diagnósticos (Siegenthaler W., Differential Diagnosis in Internal Medicine: From Symptom to Diagnosis, New York: Thieme Medical Publishers, 2007).

Entre los síntomas específicos se encuentran síntomas en las que las infecciones, especialmente las bacterianas, se consideran comúnmente como el motivo para los síntomas. Estos síntomas específicos varían dependiendo del tipo de bacteria y la localización de la infección bacteriana. Dichos síntomas específicos no se restringen al grupo sino que pueden seleccionarse de entre el grupo que comprende síntomas de cefaleas, dolor radicado en una parte específica del cuerpo (por ejemplo el abdomen), fiebre (>38°C), un síntomas respiratorio seleccionado de entre el grupo que comprende tos, producción de esputo, disnea, taquipnea y dolor pleurítico, una observación durante la auscultación (por ejemplo estertores y crepitaciones) y un signo de infección (temperatura corporal central >38°C, temblores) y un signo de infección del tracto digestivo (náuseas, vómitos y diarrea).

Se indican de manera general síndromes específicos adicionales a continuación:

los síntomas clásicos de una infección bacteriana son enrojecimiento localizado, calor, hinchazón y dolor. Uno de los signos distintivos de una infección bacteriana es el dolor local, dolor radicado en una parte específica del cuerpo. Por ejemplo, si se produce un corte y resulta infectado por bacterias, se producirá dolor en el sitio de la infección. El dolor de garganta bacteriano con frecuencia se caracteriza por más dolor en un lado de la garganta. Una infección de oído es más probable que sea bacteriana si el dolor se produce en sólo un oído.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los síntomas de infección bacteriana difieren según el tipo de infección.

Dependiendo del área infectada, los síntomas pueden variar. Sin embargo, en todos los casos se experimentan síntomas, también en el caso de que el área se encuentre infectada, incluso ligeramente. En el caso de que las infecciones bacterianas se encuentren en el tracto respiratorio, se observan síntomas relacionados con la garganta y la respiración. La infección de garganta es muy común en personas que viven en zonas con altos niveles de contaminación. La neumonía es muy común en niños y personas de edad avanzada, en los que la resistencia inmunológica natural es más baja. También se observa sinusitis y faringitis en personas que sufren de infecciones bacterianas. En el caso de que la infección bacteriana sea del tracto respiratorio comúnmente se experimenta secreción nasal de color y cefalea.

En el caso de que la infección se observe en el tracto digestivo (por ejemplo gastroenteritis), los síntomas mayoritariamente se refieren a problemas digestivos. Normalmente se experimenta inflamación y dolor en el estómago. La diarrea y los vómitos son otros síntomas que señalan a infecciones en el tracto gastrointestinal. También puede experimentarse náusea y deshidratación como resultado de síntomas graves de infección bacteriana.

El olor desagradable o a pescado en la zona vaginal es un síntoma de infección vaginal. La vagina en la mujer presenta varios tipos de bacteria que resultan beneficiosos para el órgano. Sin embargo, en el caso de que la producción de estos tipos de bacteria sea irregular, puede resultar una infección. Entre los síntomas de infección bacteriana en el tracto urinario se incluyen el picor y el dolor en los órganos urinarios. La infección vaginal y las infecciones en el tracto urinario no deben ignorarse ya que pueden provocar una inflamación adicional en órganos internos.

La meningitis es una consecuencia grave de infecciones bacterianas en las membranas que recubren el cerebro y la médula espinal. Aunque también puede presentarse en el adulto, los niños son más susceptibles a este problema. Son síntomas comunes de la infección bacteriana de la meningitis, la rigidez en el cuerpo y el cuello, las cefaleas, la irritabilidad, la fiebre o una temperatura más baja de la normal y erupciones cutáneas.

Las infecciones bacterianas más peligrosas conducen a sepsis, una condición crítica que conduce a una disfunción de órganos que provoca la muerte. La fiebre y los temblores fuertes en el cuerpo son los síntomas de la infección bacteriana en la sepsis. Los pacientes con sepsis también experimentan dolores en las articulaciones. Debe tratarse inmediatamente para impedir que la infección se extienda a órganos internos. En el caso de sepsis el paciente será ingresado en el hospital para el tratamiento intensivo.

La erisipela es una infección bacteriana aguda de la dermis que resulta en inflamación. Los pacientes típicamente desarrollan síntomas entre los que se incluyen fiebre alta, temblores, escalofríos, cefalea, vómitos, dentro de las primeras 48 horas desde la infección inicial. La lesión eritematosa de la piel se agranda rápidamente y presenta un borde elevado claramente delimitado. Presenta la apariencia de una erupción enrojecida, hinchada, caliente, endurecida y dolorosa, de consistencia similar a la corteza de la naranja. Las infecciones más graves pueden resultar en vesículas, ampollas y petequias, con posible necrosis de la piel. Los nódulos linfáticos pueden encontrarse hinchados y puede producirse linfedema. Ocasionalmente se observa una veta roja que se extiende hasta el ganglio linfático. La infección puede producirse en cualquier parte de la piel, incluyendo la cara, brazos, dedos, piernas y dedos de los pies, aunque tiende a ser más común en las extremidades. El tejido graso es el más susceptible a la infección, y las zonas faciales, típicamente en torno a los ojos, oídos y mejillas.

La peritonitis es una inflamación del peritoneo, la membrana serosa que reviste parte de la cavidad abdominal y las vísceras. La peritonitis puede ser localizada o generalizada, y puede resultar de la infección (con frecuencia debido a la ruptura de un órgano hueco, tal como puede ocurrir en un traumatismo abdominal o en la apendicitis). Las manifestaciones principales de la peritonitis son dolor abdominal agudo, sensibilidad y contracción de defensa abdominales. La localización de estas manifestaciones depende de si la peritonitis está localizada (por ejemplo apendicitis o diverticulitis antes de la perforación) o generalizada a todo el abdomen. En cualquier caso el dolor típicamente se inicia como un dolor abdominal generalizado (con participación de inervación poco localizadora de la capa peritoneal visceral) y puede convertirse en localizada posteriormente (con la participación de la capa peritoneal parietal inervada somáticamente). La perforación de una parte del tracto gastrointestinal y la rotura del peritoneo son las causas más comunes de peritonitis infecciosa.

La colangitis es una inflamación del conducto biliar. La causa más común es una infección bacteriana. La tríada clásica de la colangitis es fiebre, ictericia y dolor abdominal en el cuadrante superior derecho.

La colecistitis es una inflamación de la vesícula biliar y habitualmente se presente como dolor en el cuadrante superior derecho. Habitualmente se ve acompañada de febrícula, vómitos y náusea.

La osteomielitis se refiere a una infección del hueso o de la médula ósea. En general, los microorganismos pueden infectar el hueso mediante uno o más de los tres métodos básicos: a través del torrente sanguíneo, contiguamente de áreas locales de infección, o traumatismo penetrante, incluyendo causas iatrogénicas tales como la sustitución de una articulación o la fijación interna de fracturas o el tratamiento endodóntico. Entre los signos y síntomas de una osteomielitis se incluyen la fiebre, el dolor en la zona de infección, la hinchazón, el calor y el enrojecimiento de la

zona de infección. <http://en.wikipedia.org/wiki/Infection>:

5 La clasificación de los síndromes "inespecíficos" implica la evaluación subjetiva por parte del médico del SU. Dicha evaluación depende de factores relacionados con el método, tales como la experiencia y habilidad clínicas, y de la importancia dada a los diferentes síntomas que podrían guiar una evaluación posterior. Entre los factores relacionados con el paciente se incluyen la capacidad de verbalizar los síntomas o el estado cognitivo del paciente. Como regla general, una definición de QNE está destinada a reducir la subjetividad en la clasificación de los pacientes y, en consecuencia, facilitar una gestión proactiva estructurada del paciente. Un síntoma específico habitualmente proporciona información clave y permite generar un diagnóstico de trabajo o seguir un protocolo diagnóstico predefinido. Los síntomas específicos se encuentran bien identificados como tales en la literatura y con frecuencia se aplican protocolos diagnósticos (Marx J.A., Hockberger R., Walls R., Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical, sexta edición, ed. St. Louis, Mosby, 2005; Siegenthaler W. Differential Diagnosis in Internal Medicine: From Symptom to Diagnosis, New York, Thieme Medical Publishers, 2007).

15 En contraste con los síntomas específicos, las QNE se definen como todas los síntomas que no son parte del grupo de síntomas o signos específicos o en los que no puede establecerse un diagnóstico de trabajo inicial. Resulta preferente definir las QNE como el resto tras excluir los síntomas específicos, ya que una definición activa podría requerir una enumeración prácticamente interminable de posibles síntomas inespecíficos. Una definición larga y complicada de este tipo probablemente excluiría a determinados pacientes de QNE debido a que sus síntomas no se ajustarían exactamente a la lista predefinida. De esta manera, la lista de QNE proporcionada en la presente solicitud podría no ser completa. La expresión diagnóstica de trabajo se utiliza en el contexto de la presente definición de QNE para situaciones en las que el paciente se presenta con una QNE, aunque un diagnóstico es probable sin embargo, dados los hechos y observaciones en el momento de la presentación (por ejemplo un paciente que se presenta con debilidad y palidez anémica).

25 La figura 3 resume dicha definición de un modo procedimental. En la forma de realización más preferida, los síntomas inespecíficos se definen como síntomas que conducen a una inclusión según la figura 3. Lo anterior significa que el paciente según la invención no muestra una de los síntomas siguientes: dolor (torácico, abdominal, cabeza, pierna, articulación, espalda), disnea, tos, debilidad (localizada), síntomas de tipo ictus, hinchazón en extremidad (pierna, brazo), diarrea, disuria, GCS<14, confusión, intoxicación, crisis, hemorragia, síncope, ansiedad, síntomas psicóticos, ideación suicida, lesión en la piel, reacción alérgica en la piel, fiebre, vértigo, palpitaciones, náuseas con vómitos y traumatismos. Además, la pregunta de si existe un síntoma importante tras la evaluación inicial (historia, examen físico y lectura de ECG) que conduce a un análisis o tratamiento estandarizado es 'no'. Además, ninguno de los signos vitales (temperatura corporal, pulso o tasa cardíaca, presión sanguínea y tasa respiratoria) se encuentran fuera de rango en dicho paciente. Adicionalmente, tras la evaluación inicial no resulta posible establecer un diagnóstico de trabajo, en especial con suficiente certeza.

40 En una forma de realización muy especial de la invención de dicho grupo de pacientes con QNE, se excluyen preferentemente los pacientes con una enfermedad primaria, no siendo preferentemente dicha enfermedad primaria una infección y/o seleccionándose preferentemente de entre el grupo que comprende arterioesclerosis, insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, enfermedad coronaria, infarto de miocardio, cáncer, diabetes, enfermedades gastrointestinales crónicas, enfermedades renales crónicas, hipertensión, enfermedades ortopédicas, incluyendo osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

45 El término "nivel" en el contexto de la presente invención se refiere a la concentración (preferentemente expresada como peso/volumen, p/v) de PCT (o un fragmento/precursor) en una muestra extraída de un sujeto.

50 El término "paciente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un organismo humano o no humano vivo que está recibiendo atención médica o que debería recibir atención médica debido a una enfermedad. Lo anterior incluye personas sin ninguna enfermedad definida que están siendo investigados por signos de patología. De esta manera, los métodos y ensayos descritos en la presente memoria son aplicables a enfermedades tanto humanas como veterinarias.

55 El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra de líquido corporal obtenida con el propósito de un diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. Entre las muestras de ensayo preferentes se incluyen sangre, suero, plasma, líquido cerebroespinal, orina, saliva, esputo y efusiones pleurales. Además, el experto en la materia apreciará que algunas muestras de ensayo resultarán más fácilmente analizadas tras un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo la separación de la sangre completa en componentes suero o plasma.

60 De esta manera, en una forma de realización preferida de la invención, la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de líquido cerebroespinal, una muestra de saliva y una muestra de orina o un extracto de cualquier de las muestras anteriormente indicadas. Preferentemente, la muestra es una muestra de sangre, más preferentemente una muestra de suero o una muestra de plasma.

65

Tal como se indica en la presente memoria en el contexto de las proteínas o péptidos, el término "fragmento" se refiere a proteínas o péptidos más pequeños que pueden derivarse de proteínas o péptidos más grandes, que por lo tanto comprenden una secuencia parcial de la proteína o péptido de mayor tamaño. Dichos fragmentos pueden derivarse de las proteínas o péptidos de mayor tamaño mediante saponificación de uno o más de sus enlaces peptídicos.

La procalcitonina en el contexto de la presente invención se refiere preferentemente a un péptido entre los residuos aminoácidos 1 a 116, 2 a 116 o 3 a 116, o fragmentos de los mismos. De esta manera, la longitud de los fragmentos de procalcitonina es de por lo menos 12 aminoácidos, preferentemente de más de 50 aminoácidos, más preferentemente de más de 110 aminoácidos. La PCT puede comprender modificaciones post-traduccionales, tales como la glucosilación, la liposidación o la derivatización. La PCT misma es un precursor de la calcitonina y la catacalcina. La secuencia de aminoácidos de la PCT 1-116 se proporciona en la SEC ID nº 1.

El "diagnóstico" en el contexto de la presente invención se refiere al reconocimiento y detección (precoz) de una infección bacteriana en un sujeto y puede comprender además el diagnóstico diferencial.

La sensibilidad y especificidad de un ensayo diagnóstico depende de más de únicamente la "calidad" analítica del ensayo, también dependen de la definición de lo que constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas de características operativas del receptor (curvas COR) típicamente se calculan representando en una gráfica el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" (es decir, aparentemente sanas) y poblaciones "enfermas" (es decir, pacientes que sufren de una infección). Según la cuestión diagnóstica particular que debe resolverse, el grupo de referencia no debe ser necesariamente de "normales", sino que puede un grupo de pacientes que sufran de otra enfermedad o condición de la que se diferencia el grupo enfermo de interés. Para cualquier marcador particular, es probable que las distribuciones de niveles de marcador para los sujetos con y sin una enfermedad se solapen. Bajo estas condiciones, un ensayo no distingue de manera absoluta el estado normal de la enfermedad con una exactitud del 100% y el área de solapamiento indica en donde el ensayo no puede distinguir entre normal y enfermo. Se selecciona un umbral sobre el que (o bajo el que, según cómo cambie el marcador con la enfermedad) se considera que el ensayo presenta un resultado anormal y por debajo del cual el ensayo se considera que proporciona un resultado normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permita una identificación correcta de una condición. Las curvas ROC pueden utilizarse incluso en el caso de que los resultados del ensayo no proporcionen necesariamente un número exacto. Siempre que se puedan ordenar los resultados resulta posible crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de un ensayo con muestras "de enfermedad" deben ordenarse según grado (por ejemplo 1=bajo, 2=normal y 3=alto). Esta ordenación puede correlacionarse con resultados en la población "normal" y crearse una curva ROC. Estos métodos son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Hanley *et al.*, Radiology 143:29-36, 1982). Preferentemente se selecciona un umbral que proporcione un área bajo la curva ROC superior a aproximadamente 0,5, más preferentemente superior a aproximadamente 0,7. El término "aproximadamente" en el presente contexto se refiere a +/-5% de una medición dada.

El eje horizontal de la curva ROC representa (1-especificidad), que se incrementa con la tasa de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que se incrementa con la tasa de verdaderos positivos. De esta manera, para un valor de corte particular seleccionado, puede determinarse el valor de (1-especificidad) y puede obtenerse una sensibilidad correspondiente. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que el nivel de marcador medido permita una identificación correcta de una enfermedad o condición. De esta manera, el área bajo la curva ROC puede utilizarse para determinar la efectividad del ensayo.

Según el método, se diagnostica que el paciente presenta una infección bacteriana en el caso de que dicho nivel determinado de PCT sea superior a un nivel umbral predeterminado. Preferentemente, el nivel umbral predeterminado es de entre 0,02 y 0,5 ng/ml, más preferentemente es de entre 0,02 ng/ml y 0,25 ng/ml, todavía más preferentemente es de entre 0,02 ng/ml y 0,1 ng/ml, todavía más preferentemente es de entre 0,02 ng/ml y 0,06 ng/ml, todavía más preferentemente es de entre 0,02 ng/ml y (un valor inferior a) 0,05 ng/ml. En una forma de realización preferente, se diagnostica que el paciente presenta una infección bacteriana en el caso de que dicho nivel determinado de PCT sea superior a 0,1 ng/ml, preferentemente superior a 0,05 ng/ml, más preferentemente superior a 0,025 ng/ml.

Dichos valores han sido determinados utilizando un formato de ensayo de PCT (ensayo BRAHMS sensible a LIA de PCT), que presenta la misma calibración en el intervalo cuantitativo de medición como ensayo automatizado de PCT (ensayo BRAHMS KRYPTOR sensible a PCT). El ensayo BRAHMS sensible a LIA de PCT es capaz de determinar cuantitativamente los niveles de PCT en la población normal, proporcionando niveles de mediana de PCR, tal como se indica en la patente EP nº 09011073.5 ("Procalcitonin for the prognosis of adverse events in the asymptomatic population" [Procalcitonina para el pronóstico de sucesos adversos en la población asintomática]). Los valores anteriormente indicados podrían ser diferentes en otros ensayos de PCT, en caso de que hayan sido calibrados de manera diferente del ensayo BRAHMS sensible a LIA de PCT. Los valores anteriormente indicados resultarán de aplicación a dichos ensayos de PCT calibrados de manera diferente de acuerdo con ello, considerando las diferencias en la calibración. Una posibilidad de cuantificación de la diferencia en la calibración es un análisis (correlación) de comparación de métodos del ensayo de PCT en cuestión con el ensayo BRAHMS sensible a LIA de PCT en el que

se mide la PCT en las muestras utilizando ambos métodos. Otra posibilidad es determinar, utilizando el ensayo de PCT en cuestión, dado que este ensayo presenta una sensibilidad analítica suficiente, el nivel de la mediana de PT de una población normal representativa, comparar los resultados con los niveles de mediana de PCR tal como se indica en la patente EP 09011073.5 ("Procalcitonin for the prognosis of adverse events in the asymptomatic population") y recalcular la calibración basándose en la diferencia obtenida mediante esta comparación.

La determinación del nivel de la PCT o fragmento o precursor o fragmento del mismo en la presente memoria se lleva a cabo utilizando un método de detección y/o un ensayo diagnóstico.

Tal como se indica en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Dicho ensayo puede estar basado en la unión de un analito que debe detectarse a una o más sondas de captura con una determinada afinidad. En referencia a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad preferentemente es superior a  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

En el contexto de la presente invención, las "moléculas de captura" son moléculas que pueden utilizarse para unirse a moléculas diana o a moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, el péptido o péptidos cardiovasculares) de una muestra. De esta manera, las moléculas de captura pueden conformarse adecuadamente, tanto espacialmente como en términos de elementos de superficie, tales como la carga superficial, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, la presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unirse específicamente a las moléculas diana o a las moléculas de interés. De esta manera, la unión puede encontrarse mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, de van der Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobas o de enlace de hidrógeno, o una combinación de dos o más de las interacciones anteriormente indicadas entre las moléculas de captura y las moléculas diana o las moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de ARN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glucoproteína. Preferentemente las moléculas de captura son anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos, con suficiente afinidad para una diana o molécula de interés, e incluyendo anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo recombinante, así como derivados química y/o bioquímicamente modificados de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variante con una longitud de por lo menos 12 aminoácidos de la misma.

Los métodos de detección preferentes comprenden inmunoensayos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, el radioinmunoensayo (RIA), los inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), las matrices de perlas basadas en Luminex, los ensayos de micromatrices de proteínas y los formatos de ensayo rápido, tales como, por ejemplo, las tiras de ensayo inmunocromatográficas.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, y ensayos competitivos y no competitivos. En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo se encuentra en forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula que debe detectarse y/o cuantificarse se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, por ejemplo una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que se marca con, por ejemplo, un pigmento, un isótopo radioactivo o una fracción reactiva o catalíticamente activa. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito seguidamente se mide mediante un método apropiado. La composición y procedimientos generales implicados en los "ensayos de tipo sándwich" se encuentran bien establecidos y son conocidos por el experto en la materia (The Immunoassay Handbook, ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford, 3a ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C. *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 10(1)\_4-10, feb. de 2006; PMID: 16376134, incorporada como referencia en la presente memoria).

En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos, ambas presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en la que un primer componente de marcaje se une a la primera molécula de captura, en la que dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en la inhibición o la amplificación de la fluorescencia o la quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une a la segunda molécula de captura, de manera que al unirse ambas moléculas de captura al analito, se genera una señal medible que permite la detección de los complejos de tipo sándwich formados en la solución que comprende la muestra. Todavía más preferido, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierra rara o quelatos de tierra rara en combinación con un pigmento fluorescente o pigmento quimioluminiscente, en particular un pigmento de tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden la utilización de pigmentos que pueden, por ejemplo, seleccionarse de entre el grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, pigmentos cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexafluorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirodamina-6G (R6G5), 6-carboxirodamina-6G (RG6), rodamina, verde rodamina, rojo rodamina, rodamina 110, pigmentos BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde Oregon, coumarinas tales como umbeliferona, bencimidias tales como Hoechst 33258, fenantridinas tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Alexa

Fluor, PET, bromuro de etidio, pigmentos de acridinio, pigmentos carbozol, pigmentos fenoxazina, pigmentos porfirina, pigmentos polimetina y similares. En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en la quimioluminiscencia comprenden la utilización de pigmentos, basados en los principios físicos descritos para los materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, 4a ed., editor ejecutivo: J.I. Kroschwitz; editor: M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, vol. 15:518-562, 1993, incorporada como referencia en la presente memoria, incluyendo las citas en las páginas 551 a 562. Los pigmentos quimioluminiscentes preferentes son los ésteres de acridinio.

La infección bacteriana que podría diagnosticarse con el método de la invención puede tratarse con un antibiótico adecuado, tal como es conocido por el experto en la materia. Las posibles clases de antibiótico se seleccionan de entre el grupo que consiste de penicilina (por ejemplo flucloxacilina, amoxicilina, ampicilina y mezlocilina), cefalosporina (por ejemplo cefazolina, cefuroxim, cefotaxim, cefaclor y cefalexina), inhibidor de  $\beta$ -lactamasa (por ejemplo sulbactamo, tazobactamo), tetraciclina (por ejemplo doxiciclina, minociclina, tetraciclina y oxitetraciclina), aminoglucósidos (por ejemplo gentamicina, neomicina y estreptomina), antibióticos macrólidos (por ejemplo azitromicina, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, espiramicina y clindamicina), lincosamida (por ejemplo lincomicina), inhibidor de girasa (por ejemplo ciprofloxacino, ofloxacino y norfloxacino), sulfonamidas, trimetoprim, antibióticos glucopéptidos (por ejemplo vancomicina), antibióticos polipéptidos (por ejemplo colistina y polimixina) y anfenicol (por ejemplo cloranfenicol).

## Ejemplos

Cualesquiera pacientes que se presenten con resultados recientes de laboratorio externo o cambios de ECG específicos en el momento del ingreso (por ejemplo STEMI) no son elegibles. De manera similar, los pacientes con condiciones médicas terminales conocidas (por ejemplo cáncer de estadio terminal) ingresados en el SU no son elegibles. Se excluyeron los pacientes hemodinámicamente inestables o en el caso de que los parámetros vitales se encontrasen claramente fuera del intervalo normal (por ejemplo presión sanguínea sistólica <90 mmHg, tasa cardíaca >120/min., temperatura corporal >38,4 o <35,6 grados Celsius y tasa respiratoria >30/min.).

## Diagnóstico de infección

Se incluyó un total de 415 pacientes en el estudio. De estos 415 pacientes, se había diagnosticado en 86 una infección bacteriana (n=19, neumonía; n=17, cistitis; n=8, infecciones del tracto urinario; n=7, sepsis; n=10, urosepsis; n=1, choque séptico; n=3, bronquitis; n=9, infección de localización desconocida; n=1, peritonitis; n=1, osteomielitis; n=1, diverticulitis sigma; n=1, colitis; n=2, EPOC con exacerbación aguda; n=1, colangitis; n=1, colecistitis; n=2, erisipela, y n=2, gastroenteritis).

El diagnóstico de las infecciones en el presente estudio se llevó a cabo según criterios estándares: temperatura >37,5°C, recuento de glóbulos blancos >11.000/ml o <4.000/ml, infiltrado pulmonar en radiografías torácicas o cultivos positivos para un patógeno.

Tal como se ha indicado de manera general anteriormente, 86 de dichos 415 pacientes se había diagnosticado que sufría de una infección bacteriana (por ejemplo ITRI, infecciones del tracto urinario, sepsis y choque séptico). Entre las infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI) se incluyen bronquitis aguda, exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y neumonía. Los pacientes con ITRI muestran por lo menos un síntoma respiratorio seleccionado de entre el grupo que comprende tos, producción de esputo, disnea, taquipnea y dolor pleurítico, y además por lo menos una observación durante la auscultación (estertores o crepitación) o algún signo de infección (temperatura corporal central >38°C, temblores, recuento leucocitario >10 G/l o <4 G/l células). El diagnóstico de la infección del tracto urinario (ITU) se basa en los dos criterios siguientes: fiebre (>38°C), muestra de orina positiva para nitritos, leucocituria y bacteriuria significativa. Se definió la sepsis, la sepsis severa y el choque séptico siguiendo los criterios estándares (Levy *et al.*, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Crit. Care Med.* 31:1250-1256, 2003).

## Medición de la PCT

Se midió la PCT utilizando un sistema de ensayo ultrasensible disponible comercialmente con una sensibilidad del ensayo funcional de 0,007 ng/ml, tal como se indica en Morgenthaler *et al.* (Morgenthaler *et al.*, *Clin. Chem.* 48:788-790, 2002). Brevemente, se generaron anticuerpos de oveja contra la fracción calcitonina de la PCT y se generó un anticuerpo monoclonal de ratón contra la fracción catacalcina de la PCT. Se recubrieron tubos con el anticuerpo anti-catacalcina. El anticuerpo anti-calcitonina se marcó con MACN éster de acridinio (InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania) y sirvió de trazador. Se utilizaron diluciones de la PCR recombinante en suero de caballo normal como calibradores. Se incubaron 100  $\mu$ l de muestra o estándar en los tubos recubiertos durante 30 minutos; se añadieron 200  $\mu$ l de trazador. Tras una incubación adicional de 2 h, los tubos se lavaron 4 veces con 1 ml de solución de lavado de LIA (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania) y se midió la quimioluminiscencia unida utilizando un luminómetro LB952T (Berthold, Wildbad, Alemania).

**Resultados**

Se incluyó en el estudio un total de 415 pacientes. Se determinó el nivel de procalcitonina en muestras de plasma de los pacientes con síntomas inespecíficos inmediatamente después de la presentación en el servicio de urgencias. De estos 415 pacientes, se diagnosticó en 86 pacientes una infección bacteriana. En la figura 1 se muestran las concentraciones de PCXR en pacientes con síntomas inespecíficos con y sin una infección bacteriana. Las concentraciones de PCT eran significativamente más altas en los pacientes con infección que en los pacientes sin una infección bacteriana ( $p < 0,0001$ ). El análisis del gráfico ROC reveló un área bajo la curva (ABC) de 0,721 ( $p < 0,0001$ ) (figura 2). Se utilizaron diferentes valores de corte para determinar la sensibilidad y especificidad correspondientes (Tabla 1).

**Secuencia**

SEC ID nº 1 (secuencia de aminoácidos de la PCT):

```

1   APFRSALESS PADPATLSED EARLLLAALV QDYVQMKASE LEQEQEREGS
51  SLDSPRSKRC GNLSTCMLGT YTQDFNKFHT FPQTAIGVGA PGKKRDMSSD
101 LERDHRPHVS MPQNaN

```

**Listado de secuencias**

<110> B.R.A.H.M.S. GmbH

<120> Procalcitonina para el diagnóstico de las infecciones bacterianas y guía en el tratamiento antibiótico en pacientes con síntomas inespecíficos

<130> B60472PCT

<150> EP 10002363.9

<151> 2010-03-08

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 557 891 T3

Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Gln Asp  
20 25 30

Tyr Val Gln Met Lys Ala Ser Glu Leu Glu Gln Glu Gln Glu Arg Glu  
35 40 45

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Pro Arg Ser Lys Arg Cys Gly Asn Leu Ser  
50 55 60

Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr  
65 70 75 80

Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp  
85 90 95

Met Ser Ser Asp Leu Glu Arg Asp His Arg Pro His Val Ser Met Pro  
100 105 110

Gln Asn Ala Asn  
115

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para el diagnóstico de una infección bacteriana en un paciente que se presenta en el servicio de urgencias con síntomas inespecíficos (QNE), que comprende las etapas de:
- 10 (i) determinar el nivel de procalcitonina (PCT) o de un fragmento de la misma de por lo menos 12 aminoácidos de longitud en una muestra de un paciente que se ha presentado con síntomas inespecíficos, y
- 15 (ii) determinar si dicho paciente presenta una infección bacteriana o no mediante la comparación de dicho nivel determinado de PCT con un nivel umbral predeterminado,
- en el que el nivel umbral predeterminado es de entre 0,02 ng/ml y 0,25 ng/ml y en el que el paciente no presenta uno de los síntomas siguientes: dolor (torácico, abdominal, cabeza, pierna, articulación, espalda), disnea, tos, debilidad (localizada), síntomas de tipo ictus, extremidad hinchada (pierna, extremidad), diarrea, disuria, GCS<14, confusión, intoxicación, crisis, hemorragia, síncope, ansiedad, síntomas psicóticos, ideas de suicidio, lesión en la piel, reacción alérgica en la piel, fiebre, vértigo, palpitaciones, náusea con vómitos, traumatismo.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es de un líquido corporal, en particular sangre, suero, plasma, líquido cerebroespinal, orina, saliva o una efusión pleural.
- 25 3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el nivel umbral predeterminado es de entre 0,02 ng/ml y 0,1 ng/ml, más preferentemente de entre 0,02 ng/ml y 0,06 ng/ml, y todavía más preferentemente de entre 0,02 ng/ml y (inferior a) 0,05 ng/ml.
- 30 4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho paciente presenta una infección bacteriana cuando dicho nivel de PCT determinado es superior al nivel umbral predeterminado.
- 35 5. Método según las reivindicaciones 1 a 4 que utiliza un ensayo de detección de PCT con una sensibilidad de ensayo funcional inferior a 0,06 ng/ml.
6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha infección bacteriana se selecciona de entre el grupo que comprende una infección del tracto respiratorio inferior, infección, infección del tracto urinario, infección vaginal, sepsis, sepsis severa, choque séptico, infección del tracto digestivo, peritonitis, cistitis, colitis, meningitis bacteriana, sinusitis, faringitis, colangitis, colecistitis, osteomielitis, erisipela, peritonitis, colangitis, colecistitis y osteomielitis.
7. Método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha infección bacteriana es tratable con un antibiótico.
- 40 8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha infección bacteriana no manifiesta síntomas clínicos de una infección bacteriana.
9. Método según las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa de:
- determinar el nivel de por lo menos un marcador más, tal como la proteína C-reactiva (PCR).

Fig. 1

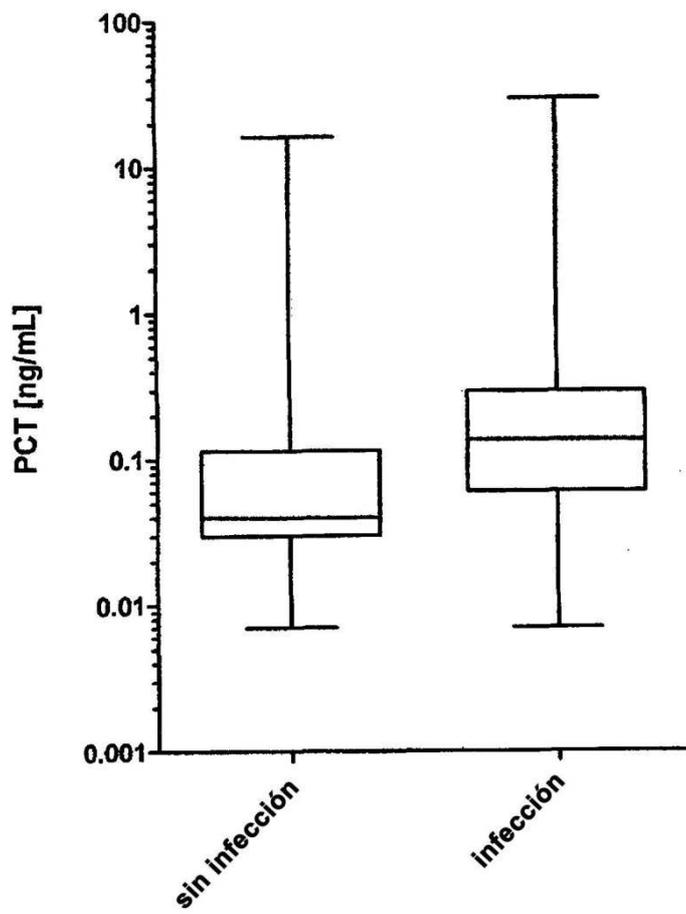


Figura 2:

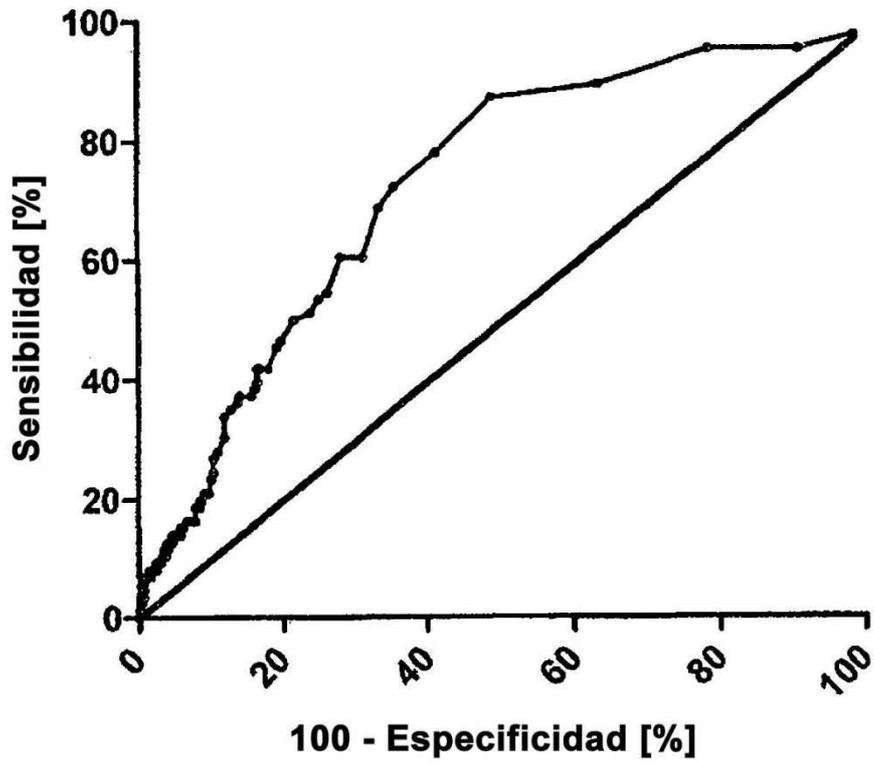
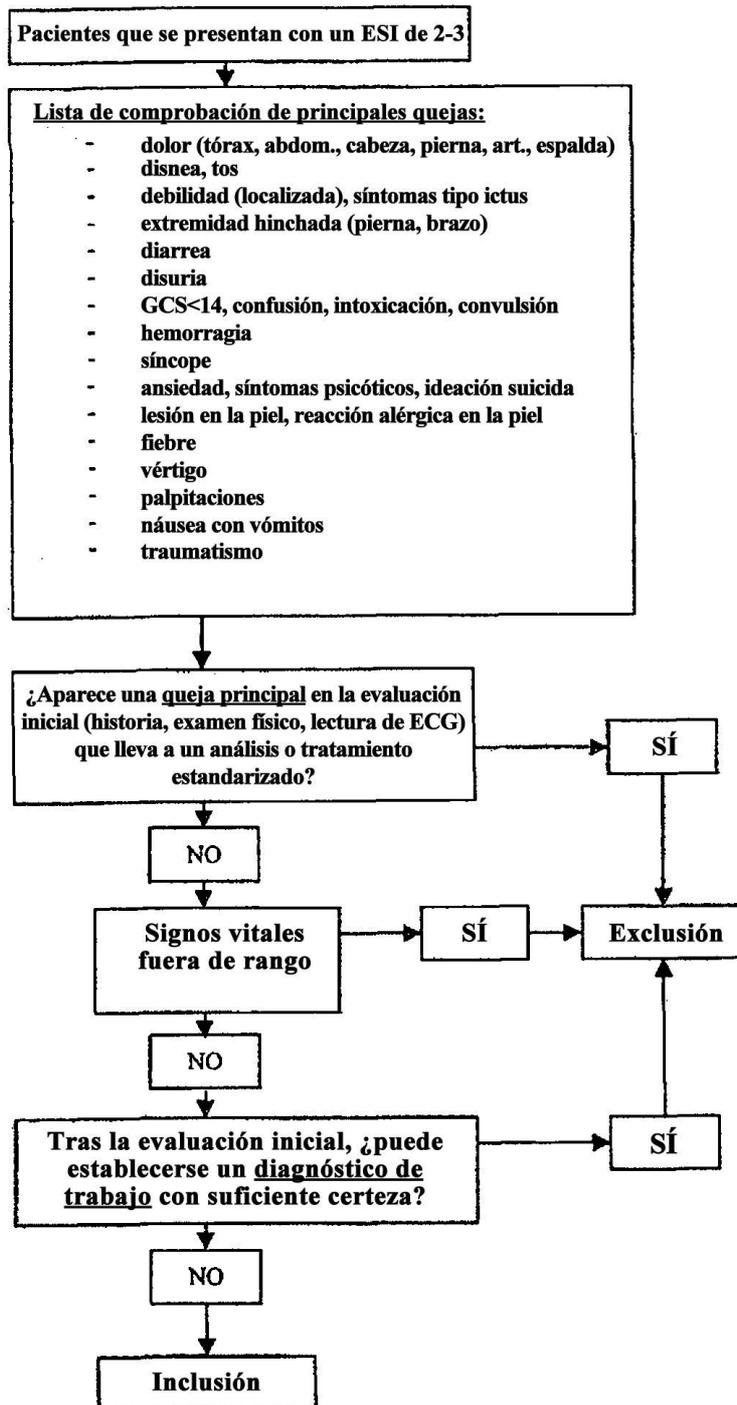


Fig. 3:



**Tabla 1:** sensibilidades y especificidades (en %) para diferentes valores de corte de PCT para pacientes que se han presentado en el SU con quejas no específicas

<b>corte de PCT [ng/ml]</b>	<b>Sensibilidad (en %)</b>	<b>Especificidad (en %)</b>
0,03	89,5	36,5
0,05	77,9	58,7
0,10	54,7	73,9
0,20	38,4	83,9
0,25	33,7	88,2
0,50	16,3	93,3