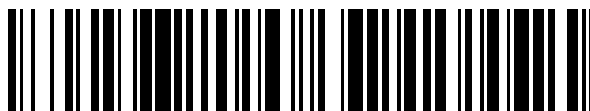


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 653**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2010** **PCT/US2010/038872**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011** **WO11008400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010** **E 10771227 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** **EP 2443250**

54 Título: **Ensayos bactericidas de opsonización y dependientes de anticuerpo mediado por el complemento de alto rendimiento**

30 Prioridad:

16.06.2009 US 187630 P

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

11.01.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**MAK, PUIYING ANNIE;
SANTOS, GEORGE;
JANES, JEFFREY EUGENE y
DONNELLY, JOHN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 596 653 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

Ensayos bactericidas de opsonización y dependientes de anticuerpo mediado por el complemento de alto rendimiento

Solicitud relacionada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medición de la actividad bactericida de opsonización y asociada con el complemento y a procedimientos para evaluar la calidad de la respuesta inmunitaria. Más específicamente, la presente invención se refiere a un ensayo bactericida automatizado en suero de alto rendimiento para determinar las correlaciones de la protección a partir de anticuerpos antibacterianos funcionales.

10 Antecedentes

Las infecciones bacterianas y la carga resultante sobre la sociedad y la atención médica de la salud en todo el mundo sigue siendo un gran desafío. Las vacunas contra enfermedades bacterianas importantes, tales como MenACWY, MenB, enfermedades por estreptococos del grupo A (GAS) o por estreptococos del grupo B (GBS), *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran actualmente en ensayos preclínicos o clínicos. El procedimiento actualmente empleado por la mayoría de los laboratorios para analizar la eficacia de una vacuna implica el análisis de muestras clínicas obtenidas de sujetos a los que se ha inoculado la vacuna para la actividad bactericida en suero (ABS) contando las colonias bacterianas supervivientes como medida de la capacidad de una vacuna para inducir una respuesta en suero en un sujeto vacunado al efecto de destruir el patógeno bacteriano analizado. Los ensayos funcionales, tales como un ensayo bactericida en suero se usan como un indicador de la eficacia en base a la suposición de que si el sujeto ha producido anticuerpos bactericidas contra el patógeno por encima de un nivel especificado, por tanto el sujeto queda protegido contra la infección por el organismo y, por tanto, que la vacuna se puede utilizar para proteger a otros contra el patógeno. Estas respuestas se miden en ratones y seres humanos y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [por ejemplo, véase la nota al final 14 de la referencia (R5) más adelante]. La actividad bactericida en suero mide la muerte de bacterias mediada por el complemento y se puede analizar usando complemento humano o animal, tal como complemento de cachorro de conejo. Las normas de la OMS requieren que una vacuna induzca al menos una elevación multiplicada por 4 de la ABS en más del 90 % de los receptores cuando se usa complemento de conejo. Los estudios publicados (*Goldschneider y col.*) asignaron un título de ABS de 1:4 usando complemento humano como un correlato de la protección contra la enfermedad meningocócica. El ensayo funcional y el umbral tal como se utiliza hoy en día son, por lo general, una subestimación de la eficacia de una vacuna, pero tal subestimación se considera en el mejor interés del público. Dado que el ensayo de ASB tradicional requiere sembrar bacterias en agar y contar las unidades formadoras de colonias (UFC) supervivientes después de una etapa de incubación durante la noche, tales ensayos consumen tiempo, ya que los ensayos a menudo tardan dos o más días, no son sencillos de usar, y por lo tanto, supone un problema estandarizar y requieren mano de obra intensa, lo que da lugar a una baja producción de muestras. Así, los ensayos de ABS tradicionales no son susceptibles de análisis de datos de los ensayos clínicos de alta precisión y de alto rendimiento. En particular, debido a la dificultad de estandarización entre los laboratorios, la generación de datos fiables con ensayos clínicos grandes y multicéntricos o de vigilancia posterior a la concesión de licencias puede ser problemática. En consecuencia, desde hace tiempo existe la intensa necesidad de desarrollar un ensayo bactericida sensible, de alto rendimiento para permitir una evaluación rápida y altamente reproducible de la eficacia de los candidatos a vacunas bacterianas.

Los problemas relacionados con el ensayo de ABS tradicional mencionado anteriormente se han reconocido, pero no se han resuelto. Inicialmente se ha descrito que el uso de alamarBlue (resazurina) mide la viabilidad de las células expuestas a agentes intoxicantes (documento US 5501959). Las células viables reducen el alamarBlue cambiando de color de azul a rosa para la medición colorimétrica y emiten una señal de fluorescencia tras la excitación. Para los ensayos de ABS, se informó de la inclusión de alamarBlue para medir la fluorescencia en lugar de contar las colonias de bacterias supervivientes, lo que sugiere una buena correlación entre el ensayo ABS tradicional y basado en la fluorescencia (*Mountzouros y col.*, 2000; *Romero-Steiner y col.*, 2004)

Sin embargo, hasta la presente solicitud, la señal se midió en placas usando medio que contiene agar (*Mountzouros y col.*, 2000), que no es adecuado usando manipuladores de líquidos automatizados, o solo se registraron las mediciones de punto final individuales (*Romero-Steiner y col.*, 2004). Por otra parte, las placas de reacción se mantuvieron sin sellar durante el ensayo (*Mountzouros y col.*, 2000; *Romero-Steiner y col.*, 2004), aumentando el riesgo de resultados inconsistentes debido a la contaminación cruzada y a la evaporación. Así pues, hasta la fecha ninguno se ha adaptado en un sistema de ensayo de alto rendimiento disponible en el mercado para medir la actividad bactericida, a pesar de la necesidad reconocida desde hace tiempo.

55 Sumario

Para medir con precisión la fluorescencia óptima o la señal colorimétrica, es deseable realizar lecturas de placas recurrentes con el fin de asegurar que al menos algunas de las mediciones se tomarán en la fase lineal en lugar de en la fase de saturación del indicador fluorescente o colorimétrico. En particular, cuando las muestras tienen una

actividad bactericida desconocida, tales lecturas óptimas son deseables para poder estandarizar el ensayo entre diferentes laboratorios. Además, con el fin de permitir la manipulación automatizada del ensayo, todos los compuestos de ensayo serán, preferentemente, líquidos y no contendrán agentes gelificantes, tales como agar, lo que podría interferir con el procedimiento de automatización. Por último, puesto que las placas se miden de forma recurrente durante un periodo de tiempo predeterminado en condiciones ambientales potencialmente diferentes, el sellado de las placas, que puede realizarse con tapas ópticas para permitir la generación de la señal de fluorescencia y la lectura sin producir evaporación, es también un componente deseable de la solución. La presente descripción aborda todos estos problemas para el desarrollo de un ensayo bactericida automatizado de alto rendimiento basado en fluorescencia.

Un aspecto incluye un procedimiento de alto rendimiento de evaluación de la actividad bactericida de una muestra que incluye proporcionar un fluido no gel sellado que comprende una cantidad de un patógeno, una muestra y un potenciador, en el que el fluido se ha incubado durante un periodo de tiempo suficiente para que la muestra mate una parte del patógeno si la muestra comprende actividad bactericida o de opsonización; medir el indicador metabólico en tres o más puntos de tiempo durante una segunda incubación; y evaluar la actividad bactericida usando las mediciones en los tres o más puntos de tiempo. En ciertas realizaciones, el indicador metabólico es un compuesto cromógeno o un compuesto fluorescente. En ciertas realizaciones, el indicador metabólico es resazurina. En ciertas realizaciones, la resazurina es alamarBlue. En ciertas formas de realización que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el patógeno es *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza B*, *H. pylori*, meningitis/sepsis asociada a *E. coli*, *Haemophilus influenzae* no tipificable, o *E. coli* uropatogénica. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el potenciador es complemento cuando se analiza la actividad bactericida o células fagocíticas y, opcionalmente, complemento cuando se analiza la actividad de opsonización. En ciertas realizaciones, las células fagocíticas son neutrófilos o macrófagos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes que incluyen células fagocíticas, las células fagocíticas se inactivan o retiran del fluido antes de la segunda incubación. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes que incluyen células fagocíticas, el indicador metabólico no responde a la actividad metabólica de las células fagocíticas. En ciertas realizaciones que contienen complemento, el complemento es complemento activo o complemento inactivo. En ciertas realizaciones, el complemento activo deriva del grupo que consiste en ser humano, conejo, cría de conejo, otro origen animal, o recombinante. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el fluido no gel no contiene agarosa o ningún otro agente gelificante utilizado para formar una superficie de crecimiento sólida para las bacterias. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el fluido no gel sellado se sella antes de la incubación del patógeno y la muestra y las mediciones para evitar la evaporación de dicho fluido. En ciertas otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el fluido no gel se sella después de la incubación del patógeno y la muestra y las mediciones para evitar la evaporación de dicho fluido. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el sellado comprende un sello ópticamente transparente para realizar mediciones colorimétricas y/o fluorimétricas sin la retirada de dicho sello. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la muestra es un anticuerpo aislado, suero o plasma de origen humano o animal. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes que contiene una muestra de suero o plasma, la muestra de suero o plasma se obtiene de un sujeto al que se inoculó una vacuna, una un candidato a vacuna o un componente de vacuna dirigida contra el patógeno. En ciertas realizaciones, el candidato a vacuna o el componente de la vacuna comprende uno o más de un antígeno GNA1870, un antígeno GNA2132, y un antígeno de NadA. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la muestra es un anticuerpo aislado, que puede ser, además, un anticuerpo recombinante. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el procedimiento incluye al menos dos fluidos no-gel, al menos tres, al menos cinco, al menos 10, en el que el segundo fluido no gel (y cada fluido no gel sucesivo) comprende una dilución de la muestra en el primer fluido no gel (o fluido no gel precedente). En ciertas realizaciones, la dilución puede ser doble, triple o cuádruple o una etapa de dilución repetitiva de dilución doble seguida de dilución doble, dilución doble seguida de dilución triple, dilución triple seguida de dilución triple, cuádruple o dilución cuádruple seguida de dilución cuádruple. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, los al menos dos (o más) fluidos no gel se incuban y se miden en placas de microtitulación seleccionadas del grupo que consiste en 96, 384 y 1536 pocillos de reacción por placa. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la etapa de medición comprende lecturas repetidas de dichas muestras a puntos de tiempo predeterminados para la determinación de un título de anticuerpos bactericidas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, los puntos de tiempo predeterminados se seleccionan del grupo que consiste en cada minuto, cada hora, y sus fracciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, al menos tres de dichos puntos de tiempo medidos están en el intervalo de medición lineal del indicador metabólico para medir el crecimiento del patógeno. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las mediciones son señales de fluorescencia que representan el crecimiento bacteriano. En ciertas realizaciones, la relación señal - ruido más alta de entre 1 a 99 % o de aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % de la meseta de la señal de fluorescencia está dentro del intervalo de la medición lineal del indicador metabólico para medir el crecimiento del patógeno. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las

realizaciones precedentes, la etapa de evaluación puede comprender la optimización del ensayo. En ciertas realizaciones, la optimización de ensayo comprende a) desarrollo de la señal usando una curva de crecimiento de bacterias, b) determinación del punto de tiempo para la señal señal-ruido óptima, y, en su caso, c) corregir la pérdida de señal a una concentración en suero alta mediante la normalización con controles que contienen el complemento inactivado. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, las etapas realizadas son totalmente automáticas. En ciertas realizaciones, la variabilidad entre operadores del ensayo completamente automatizado se reduce en comparación con un ensayo bactericida tradicional. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el número de muestras procesadas por un solo operador dentro de un período de tiempo predeterminado en comparación con el ensayo bactericida tradicional se multiplica al menos por tres. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la etapa de evaluación comprende la corrección de la pérdida de señal a concentración alta en suero mediante la normalización con un control que contenía el complemento inactivado a una concentración aproximadamente igual a la de la muestra. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, que incluye más de un fluido no gel, dicha etapa de evaluación comprende corregir la pérdida de señal a concentración alta en suero mediante la normalización con al menos dos controles que contienen complemento inactivado, en los que el segundo control comprende una dilución del primer control que es igual a la dilución del segundo fluido no gel del primer fluido no gel.

Otro aspecto incluye un procedimiento de alto rendimiento de evaluación de la actividad bactericida de una muestra que incluye proporcionar un fluido que contiene agar sellado que comprende una cantidad de un patógeno, una muestra y un complemento, en el que el fluido se ha incubado durante un período de tiempo suficiente para que la muestra mate una parte del patógeno si la muestra comprende actividad bactericida; medir el indicador metabólico en tres o más puntos de tiempo durante una segunda incubación; y evaluar la actividad bactericida usando las mediciones en los tres o más puntos de tiempo. En ciertas realizaciones, el indicador metabólico es un compuesto cromógeno o un compuesto fluorescente. En ciertas realizaciones, el indicador metabólico es resazurina. En ciertas realizaciones, la resazurina es alamarBlue. En ciertas formas de realización que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el patógeno es *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza B*, *H. pylori*, meningitis/sepsis asociada a *E. coli*, *Haemophilus influenzae* no tipificable, o *E. coli* uropatogénica. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el potenciador es complemento cuando se analiza la actividad bactericida o células fagocíticas y, opcionalmente, complemento cuando se analiza la actividad de opsonización. En ciertas realizaciones, las células fagocíticas son neutrófilos o macrófagos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes que incluyen células fagocíticas, las células fagocíticas se inactivan o retiran del fluido antes de la segunda incubación. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes que incluyen células fagocíticas, el indicador metabólico no responde a la actividad metabólica de las células fagocíticas. En ciertas realizaciones que contienen complemento, el complemento es complemento activo o complemento inactivo. En ciertas realizaciones, el complemento activo deriva del grupo que consiste en ser humano, conejo, cría de conejo, otro origen animal, o recombinante. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el fluido sellado se sella antes de la incubación del patógeno y la muestra y las mediciones para evitar la evaporación de dicho fluido. En ciertas otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el fluido se sella después de la incubación del patógeno y la muestra y las mediciones para evitar la evaporación de dicho fluido. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el sellado comprende un sello ópticamente transparente para realizar mediciones colorimétricas y/o fluorimétricas sin la retirada de dicho sello. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la muestra es un anticuerpo aislado, suero o plasma de origen humano o animal. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes que contiene una muestra de suero o plasma, la muestra de suero o plasma se obtiene de un sujeto al que se inoculó una vacuna, una un candidato a vacuna o un componente de la vacuna dirigida contra el patógeno. En ciertas realizaciones, el candidato a vacuna o el componente de la vacuna comprende uno o más de un antígeno GNA1870, un antígeno GNA2132, y un antígeno de NadA. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la muestra es un anticuerpo aislado, que puede ser, además, un anticuerpo recombinante. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el procedimiento incluye al menos dos fluidos, al menos tres, al menos cinco, al menos 10, en el que el segundo fluido (y cada fluido sucesivo) comprende una dilución de la muestra en el primer fluido (o fluido no gel precedente). En ciertas realizaciones, la dilución puede ser doble, triple o cuádruple o una etapa de dilución repetitiva de dilución doble seguida de dilución doble, dilución doble seguida de dilución triple, dilución triple seguida de dilución triple, cuádruple o dilución cuádruple seguida de dilución cuádruple. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, los al menos dos (o más) fluidos se incuban y se miden en placas de microtitulación seleccionadas del grupo que consiste en 96, 384 y 1536 pocillos de reacción por placa. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la etapa de medición comprende lecturas repetidas de dichas muestras a puntos de tiempo predeterminados para la determinación de un título de anticuerpos bactericidas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, los puntos de tiempo predeterminados se seleccionan del grupo que consiste en cada minuto, cada hora, y sus fracciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, al menos tres de dichos puntos de tiempo medidos están en el intervalo

de medición lineal del indicador metabólico para medir el crecimiento del patógeno. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las mediciones son señales de fluorescencia que representan el crecimiento bacteriano. En ciertas realizaciones, la relación señal - ruido más alta de entre 1 a 99 % o de aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % de la meseta de la señal de fluorescencia está dentro del intervalo de la medición lineal del indicador metabólico para medir el crecimiento del patógeno. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la etapa de evaluación puede comprender la optimización del ensayo. En ciertas realizaciones, la optimización de ensayo comprende a) desarrollo de la señal usando una curva de crecimiento de bacterias, b) determinación del punto de tiempo para la señal señal-ruido óptima, y, en su caso, c) corregir la pérdida de señal a una concentración en suero alta mediante la normalización con controles que contienen el complemento inactivado. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, las etapas realizadas son totalmente automáticas. En ciertas realizaciones, la variabilidad entre operadores del ensayo completamente automatizado se reduce en comparación con un ensayo bactericida tradicional. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el número de muestras procesadas por un solo operador dentro de un período de tiempo predeterminado en comparación con el ensayo bactericida tradicional se multiplica al menos por tres. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la etapa de evaluación comprende la corrección de la pérdida de señal a concentración alta en suero mediante la normalización con un control que contenía el complemento inactivado a una concentración aproximadamente igual a la de la muestra. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, que incluye más de un fluido, dicha etapa de evaluación comprende corregir la pérdida de señal a concentración alta en suero mediante la normalización con al menos dos controles que contienen complemento inactivado, en los que el segundo control comprende una dilución del primer control que es igual a la dilución del segundo fluido del primer fluido.

Otro aspecto incluye un ensayo para la evaluación de alto rendimiento de la actividad bactericida de una muestra que comprende un kit para la práctica de cualquiera de los aspectos anteriores, en todas y cada una de sus diversas realizaciones.

Otro aspecto incluye procedimientos implementados por ordenador para determinar una actividad bactericida de una muestra hacia un patógeno, que comprende obtener, utilizando un procesador, un conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos tomadas en un punto de tiempo de incubación establecido a partir de una serie de dilución de los cultivos de incubación, en el que los cultivos de incubación comprenden una cantidad del patógeno, complemento, y un indicador metabólico y en el que cada uno de los cultivos de incubación comprenden además una cantidad diferente de la muestra en base a una serie de dilución predeterminada, en el que el punto de tiempo de incubación establecido corresponde a un tiempo en el que el patógeno está en crecimiento rápido en un cultivo de incubación sin actividad bactericida; obtener, usando el procesador, un conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos tomadas en el punto de tiempo de incubación establecido a partir de una serie de dilución de los cultivos de incubación de normalización, en el que la serie de dilución de los cultivos de incubación de normalización corresponde a la serie de dilución de los cultivos de incubación excepto que la serie de dilución de incubación de normalización no comprenden actividad bactericida; normalizar, utilizando el procesador, el conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos utilizando el conjunto de mediciones de normalización para producir un conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos normalizadas; y determinar, usando el procesador, la actividad bactericida de la muestra ajustando una curva sigmoidea al conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos normalizados para determinar la dilución a la cual se produce la inhibición del crecimiento semimáxima. En ciertas realizaciones, se determina el punto de tiempo de incubación establecido, utilizando el procesador, mediante la identificación en una curva de crecimiento de un cultivo de incubación sin actividad bactericida de los dos puntos de tiempo de la curva de crecimiento entre los cuales el aumento de la medición del indicador metabólico es el más grande y el establecimiento del punto de tiempo de incubación establecido más tarde de los dos puntos de tiempo. En otras realizaciones, se determina el punto de tiempo de incubación establecido, utilizando el procesador, mediante la identificación en una curva de crecimiento de un cultivo de incubación sin actividad bactericida de la meseta de saturación de las mediciones de los indicadores metabólicos y estableciendo el punto de tiempo de incubación establecido en el tiempo en la curva de crecimiento cuando la medición del indicador metabólico es entre 30 % y 90 % de la meseta de saturación.

Sumario de las figuras

La Figura 1 muestra una comparación de títulos utilizando lecturas de fluorescencia y estándar para el ensayo bactericida. Las muestras de suero humano (leyenda) recogidas del ensayo clínico se analizaron en paralelo con ensayos bactericidas que utilizan UFC (eje x) y alamarBlue (eje y) como lectura. Cada punto de datos representa el resultado de un ensayo concurrente y las muestras se analizaron en varias fechas. Cada muestra se analiza sin duplicado en el ensayo bactericida tradicional (EBC) durante la reacción bactericida pero la mezcla de reacción se sembró dos veces para el recuento de colonias. El promedio de los valores de UFC se utilizó para calcular el título interpolado. Cualquier título de <2 se representa como 1,0 en el gráfico anterior. Para el (HT) – EBC, de alto rendimiento, cada muestra de suero se analizó por triplicado durante la reacción bactericida. El título se calculó como se describe en el texto. El promedio del triplicado y la desviación estándar se representó en el gráfico anterior.

La Figura 2 demuestra la comparación de los títulos resultantes en una buena correlación entre las lecturas de fluorescencia estándar y de fluorescencia para el ensayo bactericida usando la cepa MenB 44/76-SL. Los datos se recogieron a partir de dos ensayos pareados, cuando cada par de EBC estándar y fluorescente se realizó el mismo día. Los ensayos utilizando complemento en suero y plasma humano se combinaron para el análisis.

5 La Figura 3 muestra la comparación de los títulos resultante en una buena correlación entre las lecturas de fluorescencia y estándar para el ensayo bactericida usando la cepa MenB 5/99. Los datos se recogieron de dos ensayos apareados, cuando cada par de EBC estándar y fluorescente se realizó el mismo día. Los ensayos utilizando complemento en suero y plasma humano se combinaron para el análisis.

10 La Figura 4 representa los títulos calculados a partir del ensayo mostrado en la figura 3. Los sueros humanos analizados en el ensayo bactericida eran sueros DU-02 preinmunes y sueros DU-11 y DU-12 sueros que fueron posteriores a la tercera dosis. El título de la media geométrica de todos los sueros después de la inmunización fue 191 usando la lectura basada en agar y 173 usando el procedimiento de lectura basado en la fluorescencia. Cinco de los seis sueros preinmunes mostraron títulos de <4 en ambos ensayos. El tiempo de desarrollo de fluorescencia fue de 7 horas.

15 La Figura 5 muestra una curva de crecimiento bacteriano y las señales de fluorescencia resultantes generadas por el crecimiento de NZ98/254 en placas de microtitulación en 7 experimentos independientes. Los cálculos del título se llevaron a cabo utilizando datos de cada punto de tiempo por hora a de 4 a 9 horas después de la reacción bactericida (área del recuadro gris)

20 La Figura 6 demuestra la correlación de los títulos determinados por la señal de fluorescencia (eje y) y el ensayo convencional (eje x) en múltiples puntos de tiempo durante la reacción de posbactericida contra la cepa MenB NZ98-254. Los cálculos del título se llevaron a cabo utilizando datos de cada punto de tiempo por hora a de 4 a 9 horas después de la reacción bactericida.

25 La Figura 7 demuestra la corrección de un efecto de suero en el título resultante. La señal de fluorescencia se inactivó mediante la concentración sérica elevada, por lo que era necesaria la normalización. Los valores en bruto de la muestra de ensayo DU02-01052 con complemento activo (A; círculos oscuros) se dividieron por las correspondientes series de dilución del complemento inactivado por calor (A; cuadrados grises). Los valores normalizados (B) se utilizaron para el cálculo del título. Las barras negras indican el corte de la CI_{50} .

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

30 La divulgación proporciona procedimientos, composiciones y kits para la realización de ensayos automáticos y/o de alto rendimiento para medir la actividad bactericida en muestras, tales como plasma o suero, de sujetos vacunados o preparaciones de anticuerpos, para evaluar la eficacia de vacunas o terapias inmunes pasivas contra patógenos bacterianos. Los ensayos automáticos y/o de alto rendimiento divulgados en el presente documento satisfacen una necesidad existente desde hace tiempo y, sin embargo, no resueltas anteriormente para permitir la manipulación automática y/o de alto rendimiento de dichos ensayos, que puede reducir adicionalmente la variabilidad entre
35 ensayos y entre operadores cuando se evalúa la actividad bactericida. En particular, los ensayos automáticos y/o de alto rendimiento pueden incluir lecturas de la reacción de la muestra recurrentes que aseguran, preferentemente, que al menos se toman algunas mediciones en el intervalo lineal del indicador metabólico mientras el patógeno está en la fase log de su crecimiento (es decir, el indicador metabólico no se encuentra en su fase de saturación y el patógeno no se encuentra en su fase de latencia o fase estacionaria). Tales lecturas recurrentes pueden ser
40 particularmente ventajosas para las muestras con una actividad bactericida desconocida, en las que se desea una lectura óptima para que los ensayos puedan estandarizarse entre diferentes laboratorios u operadores para mejorar la precisión y la reproducibilidad de los datos. Además, la implementación de compuestos líquidos que no contienen agentes gelificantes, tales como agar, que podrían interferir con el procedimiento de automatización, es otro aspecto deseable que se puede combinar con las otras mejoras divulgadas en el presente documento. Y puesto que las
45 reacciones de la muestra se miden recurrentemente durante un periodo de tiempo predeterminado en condiciones ambientales potencialmente diferentes, el cierre de las placas con tapas ópticas para permitir la generación les y la lectura de seña sin causar evaporación ni contaminación cruzada entre los pocillos de reacción es otro aspecto deseable que puede combinarse con los otros aspectos divulgados en el presente documento. Por otra parte, el potencial del uso de placas que permiten un mayor número de muestras por placa de 96 pocillos, tales como placas
50 de 384 pocillos, no solo aumentaría la velocidad y la eficiencia al aumentar la manipulación de las muestras y la inclusión de controles adicionales por placa, sino que también reduciría el volumen de reactivo y de la muestra, con el fin de reducir los costes y de medir muestras limitadas, tales como colecciones de lactantes, y permitir las mediciones repetidas de la misma muestra. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la medición automatizada de alto rendimiento de la actividad bactericida que incluye, preferentemente, mejor
55 variabilidad entre ensayos y entre operadores.

Vacunas e inmunoterapias pasivas

Los procedimientos, composiciones y kits divulgados en el presente documento pueden aplicarse a cualquier vacuna o inmunoterapia pasiva contra patógenos bacterianos, siempre y cuando el patógeno bacteriano sea susceptible a

ensayos bactericidas mediados por el complemento dependientes de anticuerpos en general. Las siguientes realizaciones son ejemplos de las vacunas que se pueden analizar usando los procedimientos, composiciones y kits divulgados. Cuando se mencionan los componentes particulares de una vacuna, tales como polisacáridos capsulares o antígenos proteicos, un experto en la técnica entenderá que los ensayos divulgados en el presente documento se pueden usar para evaluar la eficacia de los componentes individuales mediante la vacunación de un sujeto con el componente, así como evaluar la eficacia de la totalidad de la vacuna. La siguiente lista es ilustrativa de los tipos de vacunas que pueden analizar, así como los tipos de patógenos bacterianos que pueden incluirse en los ensayos.

En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*. En otras realizaciones, tales vacunas comprenden además un antígeno de uno o más de los siguientes: (a) *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* tipo B; *Staphylococcus aureus*, estreptococos de los grupos A y B, *E. coli* patógena y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*.

En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen los serogrupos B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B y los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B y los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B y los serogrupos B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B y los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *S. pneumoniae* y los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *S. pneumoniae* y los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *S. pneumoniae* y los serogrupos B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *S. pneumoniae* y los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *S. pneumoniae* y los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones, las vacunas analizadas incluyen *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.

Los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento se pueden utilizar para determinar la eficacia de vacunas para diversos sujetos animales, incluyendo mamíferos, tales como sujetos humanos y no humanos, incluyendo, por ejemplo, animales domésticos, aves, y similares de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas preferidas serán vacunas con componentes proteicos que pueden expresarse de forma recombinante u obtenerse del organismo patógeno.

Los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento pueden usarse para evaluar la fabricación de una vacuna para verificar que cada lote fabricado demuestra la eficacia requerida.

Las vacunas y/o patógenos adecuados que pueden analizarse usando los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a los mismos, cualquier material que produce una respuesta inmunitaria humoral. Las vacunas analizadas adecuadas pueden incluir antígenos bacterianos vivos y antígenos bacterianos inactivados, toxoides, toxinas, proteínas, glicoproteínas, péptidos, y similares, numerosos ejemplos de las cuales se describen a continuación. Las vacunas pueden incluir adicionalmente uno o más adyuvantes u otras composiciones inmunoestimulantes.

A. Patógenos bacterianos generales y vacunas para los mismos

Los patógenos bacterianos y las vacunas correspondientes adecuadas para la inducción de anticuerpos bactericidas medidos mediante el ensayo con los procedimientos, composiciones y kits divulgados incluyen: vacunas basadas en proteínas, lipoproteínas, proteoglicanos, polisacáridos, lipopolisacáridos, y vesículas de la membrana externa que pueden aislarse, purificarse o derivarse de bacterias. Además, las vacunas pueden incluir lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivadas. Las vacunas pueden incluir antígenos bacterianos producidos por expresión recombinante. Entre tales antígenos bacterianos se incluyen, preferentemente, epítomos que están expuestos en la superficie de las bacterias durante al menos una etapa de su ciclo de vida. Los antígenos bacterianos se conservan, preferentemente, a través de múltiples serotipos. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias que se exponen a continuación, así como los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación.

Neisseria meningitidis: Las vacunas contra meningitis pueden incluir proteínas (tales como las identificadas en las referencias 1-7, enumeradas en [0092]), sacáridos (incluyendo un polisacárido, oligosacárido o lipopolisacárido), o vesículas de la membrana externa (referencias 8, 9, 10, 11, que se enumeran en [0092]) purificadas o derivadas de un serogrupo de *N. meningitidis*, tales como A, C, W135, Y, y/o B. Los antígenos proteicos de *Meningitidis* para su uso en vacunas se pueden seleccionar de adherencias, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de Fe y proteínas asociadas a la membrana (preferentemente, proteína de membrana externa integral).

Streptococcus pneumoniae: Las vacunas contra *Streptococcus pneumoniae* pueden incluir un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y/o proteína de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacáridos se pueden seleccionar de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, HA, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Los antígenos proteicos se pueden seleccionar a partir de una proteína identificada en los documentos WO98/18931, WO98/18930, la patente de Estados Unidos 6.699.703, la patente de Estados Unidos 6.800.744, el documento WO97/43303 y el documento WO97/37026. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* se pueden seleccionar de la familia Triad de poli histidina (PhtX), la familia de la proteína de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, la familia de LytX, truncados de LytX, las proteínas quiméricas de truncados de CbpX-truncados de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, SP128, SplO1, Sp130, SP125 o Spl33.

Streptococcus pyogenes (estreptococos del grupo A): Las vacunas contra los estreptococos del grupo A pueden incluir una proteína identificada en los documentos WO02/34771 o WO05/032582 (Incluyendo GAS 40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluyendo los descritos en el documento WO02/094851 y Dale, Vacunas (1999) 17: 193-200 y Dale, Vaccine 14 (10): 944-948), la proteína de unión a fibronectina (Sfbl), la proteína asociada al hemo de estreptococos (Shp) y estreptolisina S (SagA).

Moraxella catarrhalis: Las vacunas contra Moraxella incluyen antígenos identificados en los documentos WO02/18595 y WO99/58562, antígenos de la proteína de membrana externa (OMP-HMW), C-antígeno, y/o LPS.

Bordetella pertussis: Las vacunas contra Pertussis incluyen la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o antígenos aglutinógenos 2 y 3.

Staphylococcus aureus: Las vacunas contra *Staphylococcus aureus* incluyen los polisacáridos capsulares de tipo 5 y 8 de *S. aureus* opcionalmente conjugados con la exotoxina A recombinante no tóxica de *Pseudomonas aeruginosa*, tal como StaphVAX (TM), o antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, cinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben la inmersión fagocítica (cápsula, Proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factor de coagulación y/o toxinas que dañan la membrana (opcionalmente dextoxificadas) que lisan las membranas de células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina).

Staphylococcus epidermidis: Las vacunas contra *S. epidermidis* incluyen el antígeno asociado con el limo (SAA).

Clostridium tetani (tétanos): Las vacunas del tétanos incluyen el toxoide del tétanos (TT), que se utiliza preferentemente como una proteína transportadora junto con/ conjugada con las composiciones de la presente invención.

Corynebacterium diphtheriae (difteria): Las vacunas contra la difteria incluyen la toxina de la difteria, preferentemente destoxificada, tales como CRM₁₉₇. Además, los antígenos capaces de modular, inhibir o asociarse con ADP ribosilación se contemplan para la combinación/coadministración/conjugación con las composiciones de la presente invención. Los toxoides de la difteria pueden ser utilizadas como proteínas transportadoras.

Haemophilus influenzae B (Hib): Las vacunas contra Hib incluyen antígenos proteicos de Hib y antígenos de sacárido Hib.

Pseudomonas aeruginosa: Las vacunas contra Pseudomonas incluyen endotoxina A, proteína WZZ, LPS de *P. aeruginosa*, más particularmente LPS aislado de PAO1 (serotipo 05), y/o proteínas de la membrana externa, incluyendo las proteínas de la membrana externa F (OprF) /

Legionella pneumophila: Las vacunas bacterianas pueden derivarse de *Legionella pneumophila*.

Streptococcus agalactiae (estreptococos del grupo B): Las vacunas contra los estreptococos del grupo B incluyen un antígeno proteico o sacárido identificado en los documentos WO02/34771, WO03/093306, WO04/041157 o WO05/002619 (Incluyendo las proteínas GBS 80, GBS 104, GBS 276 y GBS 322, e incluyendo los antígenos sacáridos derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII).

Neisseria gonorrhoeae: Las vacunas contra Gonorrhoeae incluyen la proteína Por (o porina), tal como PorB (véase Zhu et al, Vaccine (2004) 22:660 – 669), una proteína de unión de transferencia, tal como TbpA y TbpB (véase Price et al, Infection and Immunity (2004) 71 (1): 277-283), una proteína de opacidad (tal como Opa), una proteína modificable por reducción (Rmp), y preparaciones de vesículas de membrana externa (VME) (véase Plante et al, J Enfermedades Infecciosas (2000) 182 848 - 855), también véanse, por ejemplo, los documentos WO99/24578,

WO99/36544, WO99/57280, WO02/079243).

Chlamydia trachomatis: Las vacunas contra *Chlamydia trachomatis* incluyen antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes de tracoma, una causa de ceguera), serotipos L1, L2 y L3 (asociados con *Linfogranuloma venéreo*), y los serotipos D-K de *Chlamydia trachomatis* también pueden incluir un antígeno identificado en los documentos WO00/37494, WO03/049762, WO03/068811o WO05/002619, Incluyendo PepA (CT045), LCRE (CT089), ArtJ (CT381), DnaK (CT396), CT398, OmpH similar (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), Atoss (CT467), CT547, Eno (CT587), hrta (CT823), y murg (CT761).

Treponema pallidum (sífilis): Las vacunas contra la sífilis incluyen el antígeno TmpA.

Haemophilus ducreyi (causante del chancroide): Las vacunas contra Ducreyi incluyen la proteína de membrana externa (DsrA).

Enterococcus faecalis o Enterococcus faecium: Las vacunas incluyen una repetición de trisacárido u otros antígenos derivados de enterococos proporcionados en la patente de Estados Unidos 6.756.361.

Helicobacter pylori: Las vacunas contra *H. pylori* incluyen Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y/o antígeno de ureasa.

Staphylococcus saprophyticus: Las vacunas incluyen la hemaglutinina de 160 kDa del antígeno de *S. saprophyticus*.

Yersinia enterocolitica: Las vacunas incluyen LPS (Infect Immun. 2002 August; 70(8): 4414).

E. coli: Las vacunas contra *E. coli* pueden derivar de *E. coli* asociada con meningitis/sepsis (MNEC) (incluyendo los antígenos divulgados en el documento WO06/089264), *E. coli* uropatogénica (UPEC) (incluyendo los antígenos divulgados en el documento WO06/091517), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Bacillus anthracis (ántrax): Las vacunas contra *B. anthracis* están opcionalmente destoxificadas y se pueden seleccionar de componentes A (factor de letalidad (FL) y factor de edema (FE)), los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (AP).

Yersinia pestis (peste): Las vacunas contra la peste incluyen el antígeno capsular F1, LPS y el antígeno V de *Yersinia pestis*.

Mycobacterium tuberculosis: Las vacunas contra la tuberculosis incluyen lipoproteínas, LPS, antígenos de BCG, una proteína de fusión del antígeno 85B (Ag85B) y/o ESAT-6 opcionalmente formulado en vesículas de lípidos catiónicos (Infect Immun. 2004 October; 72(10): 6148), antígenos asociados con la isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y/o antígenos MPT51 (Infect Immun. 2004 July; 72(7): 3829).

Rickettsia: Las vacunas incluyen proteínas de la membrana externa, incluyendo la proteína A y/o B de la membrana externa (OmpB) (Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 1; 1702(2): 145), LPS y el antígeno de la proteína de superficie (SPA) (JAutoimmun. 1989 Jun; 2 Supl.:81).

Listeria monocytogenes: Las vacunas bacterianas pueden derivarse de *Listeria monocytogenes*.

Chlamydia pneumoniae: Las vacunas incluyen las identificadas en el documento WO02/02606.

Vibrio cholerae: Las vacunas incluyen antígenos de proteinasa, LPS, en particular lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos específicos de O1 Inaba O, V. V. cholerae O139, antígenos de la vacuna IEM108 {Infect Immun. 2003 Oct; 71(10):5498–504}, y/o la toxina de *Zonula occludens* (Zot).

Salmonella typhi (fiebre tifoidea): Las vacunas incluyen los antígenos proteicos y los polisacáridos capsulares, preferentemente conjugados (VI, es decir, vax-TyVi).

Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme): Las vacunas incluyen lipoproteínas (tales como OspA, OspB, OspC y Osp D), otras proteínas de superficie tales como proteínas relacionadas con OspE (Erps), proteínas de unión a decorina (tales como DbpA), y proteínas VI antígenicamente variables, tales como antígenos asociados con P39 y P13 (una proteína de membrana integral) proteína de variación antigénica VlsE.

Porphyromonas gingivalis: Las vacunas incluyen la proteína de la membrana externa de *P. gingivalis* (OMP).

Klebsiella: Las vacunas incluyen una OMP, incluyendo OMP A o un polisacárido conjugado opcionalmente con el toxoide tetánico.

Otras vacunas bacterianas de la divulgación puede incluir antígenos capsulares, antígenos de polisacáridos o antígenos proteicos de cualquiera de los anteriores. Otras vacunas bacterianas también pueden incluir una preparación de vesículas de membrana externa (VME). Cuando se utiliza una VME, se pueden producir anticuerpos bactericidas preferidos contra un epítipo dominante en la VME, tales como PorA en el caso de *N. meningitidis*.

Además, las vacunas incluyen versiones vivas, atenuadas, y/o purificadas de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente. Las vacunas se pueden derivar de bacterias gramnegativas o grampositivas. Las vacunas pueden derivar de bacterias aerobias o anaerobias.

Además, cualquiera de los sacáridos derivados de bacterias anteriores en una vacuna (polisacáridos, LPS, LOS u oligosacáridos) se pueden conjugar con otro agente o antígeno, tal como una proteína transportadora (por ejemplo CRM₁₉₇). Tal conjugación puede ser conjugación directa efectuada mediante aminación reductora de restos carbonilo en el sacárido con grupos amino en la proteína, según se proporciona en la patente de Estados Unidos n.º 5.360.897 y Can J Biochem Cell Biol. 1984 May;62(5):270-5. Como alternativa, los sacáridos pueden conjugarse a través de un enlazador, tal como, con succinamida u otros enlaces proporcionados en Bioconjugate Techniques, 1996 and CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, 1993.

B. Bacterias causantes de ETS y vacunas contra las mismas

Entre los patógenos y vacunas adicionales que pueden analizarse con los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento se incluyen patógenos que causan una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Tales vacunas pueden proporcionar profilaxis o tratamiento de ETS, tales como clamidia, gonorrea, sífilis y/o chancroide (véase, el documento WO00/15255). Las vacunas pueden incluir antígenos derivados de una o más ETS bacterianas. Entre los patógenos causantes de ETS analizables a continuación en el presente documento se incluyen *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *E. coli* y *Streptococcus agalactiae*. Ejemplos de vacunas específicas contra estos patógenos y componentes de tales vacunas se han descrito anteriormente.

C. Bacterias causantes de enfermedades respiratorias y vacunas para las mismas

Entre los patógenos y vacunas adicionales que pueden analizarse con los procedimientos, composiciones y kits divulgados en el presente documento se incluyen patógenos que causan una enfermedad respiratoria. Por ejemplo, entre los patógenos que causan enfermedades respiratorias se incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Ejemplos de vacunas específicas contra estos patógenos y componentes de tales vacunas se han descrito anteriormente.

D. Vacuna pediátrica

Entre los patógenos y vacunas adicionales que pueden analizarse con los procedimientos, composiciones y kits divulgados en el presente documento se incluyen patógenos contra los que se vacunan a los sujetos pediátricos. La aplicación de los procedimientos y ensayos divulgados en el presente documento a las vacunas pediátricas, los anticuerpos bactericidas analizados pueden haber sido obtenidos de pacientes pediátricos similares o un organismo modelo para este tipo de pacientes pediátricos. Los sujetos pediátricos normalmente tienen menos de aproximadamente 3 años de edad o menos de aproximadamente 2 años de edad o menos de aproximadamente 1 año de edad. Las vacunas pediátricas pueden incluir antígenos derivados de bacterias que pueden estar dirigidos a poblaciones pediátricas y/o bacterias contra las que las poblaciones pediátricas son susceptibles a la infección. Entre los ejemplos de patógenos se incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae* B (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), y *E. coli*. Ejemplos de vacunas específicas contra estos patógenos y componentes de tales vacunas se han descrito anteriormente.

E. Vacunas para su uso en ancianos o individuos inmunocomprometidos

Entre las vacunas adicionales que pueden analizarse con los procedimientos, composiciones y kits divulgados en el presente documento se incluyen uno o más antígenos adecuados para su uso en ancianos o individuos inmunocomprometidos. Entre los ejemplos de patógenos se incluyen *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae* B (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Clamydia pneumoniae*. Ejemplos de vacunas específicas contra estos patógenos y componentes de tales vacunas se han descrito anteriormente.

G. Serogrupo B de Neisseria Meningitidis

Un patógeno preferido es *N. meningitidis*, serogrupo B. Dos ejemplos de vacuna preferida para *N. meningitidis* de serogrupo B son (i) una vacuna de cinco componentes que comprende tres componentes principales: NadA, GNA1870 y GNA2132; y dos componentes accesorios GNA1030 y GNA2091. En ciertas realizaciones, los componentes accesorios pueden fusionarse con los componentes principales, preferentemente GNA1030 se fusiona con el C-terminal de GNA2132 y GNA1870 se fusiona con el C-terminal de GNA2091. Una divulgación adicional con respecto a la vacuna de cinco componentes se puede encontrar en el documento WO04/032958. En ciertas realizaciones, la vacuna de cinco componentes puede combinarse con una preparación de membrana derivada de

una cepa de *N. meningitidis* de serogrupo B, preferentemente una preparación de membrana VME.

Antígenos NadA. “NadA” (adhesina A de Neisseria) del serogrupo B de *N. meningitidis* se divulga como proteína “961” en la referencia (R3) (SEQ ID 2943 Y 2944) y como “NMB1994” en la referencia (R2) (véanse también los números de acceso en GenBank: 11352904 & 7227256). Una descripción detallada de la proteína se puede encontrar en la referencia (R9). No hay proteína correspondiente en el serogrupo A ((R1), (R9)).

NadA puede tomar varias formas en las vacunas. Las formas preferidas de NadA son variantes de truncamiento o delección, tales como las divulgadas en las referencias (R6), (R7), y (R8). En particular, se prefiere NadA sin su ancla en la membrana en C terminal (*por ejemplo*, delección de los residuos 351 405 para la cepa 2996), que a veces se distingue en el presente documento por el uso de superíndice “C”, *por ejemplo* NadA^(C). La expresión de NadA sin su dominio de anclaje a la membrana en *E. coli* tiene como resultado la secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo con la eliminación concomitante de su péptido líder 23mer (*por ejemplo*, para dejar un 327mer para la cepa 2996). En la presente memoria descriptiva en ocasiones los polipéptidos sin sus péptidos líder se distinguen mediante el uso de un “NL” en superíndice, *por ejemplo* NadA^(NL) o NadA^{(C)(NL)}. NadA se produce en tres variantes alélicas principales, como se muestra en la Figura 9 de la referencia (R10).

Las vacunas también pueden comprender fragmentos que comprenden un epítipo de NadA en cuyo caso, la detección del epítipo en un patógeno de interés puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal frente al epítipo.

La NadA secretada puede prepararse de forma conveniente en forma altamente pura a partir del sobrenadante del cultivo mediante un procedimiento que comprende las etapas de: Concentración y diafiltración contra un tampón mediante ultrafiltración; cromatografía en columna aniónica; cromatografía en columna hidrófoba; cromatografía en columna cerámica de hidroxilapatita; diafiltración contra un tampón; y esterilización con filtro. Detalles adicionales del procedimiento se proporcionan en los ejemplos.

La NadA se usa, preferentemente, en forma oligomérica (*por ejemplo*, en forma trimérica).

Antígenos GNA1870. La proteína “GNA1870” del serogrupo B se divulga como proteína “741” en la referencia (R3) (SEQ ID 2535 & 2536) y como “NMB1870” en la referencia (R2) (véase también el número de acceso en GenBank GI:7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A (R1) tiene un número de registro en GenBank 7379322. GNA1870 es en su forma natural una lipoproteína.

Cuando está como antígeno en una vacuna, la proteína GNA1870 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de GNA1870 son variantes de truncamiento o delección, tales como las divulgadas en las referencias (R6), (R7), y (R8). En particular, el extremo N de GNA1870 puede deleccionarse hasta e incluyendo su secuencia de poliglicina (*es decir*, delección de los residuos 1 a 72 para la cepa MC58), que a veces se distingue en el presente documento por el uso de un prefijo “ΔG”. Esta delección puede potenciar la expresión. La delección también elimina el sitio de lipidación de GNA1870.

Las formas alélicas de GNA1870 también se pueden usar como antígenos y ejemplos de alelos se pueden encontrar en las SEQ ID 1 a 22 de la referencia (R8), y en las SEQ ID 1 a 23 de la referencia (R11). Las SEQ ID 1–299 de la referencia (R12) dan más secuencias GNA1870.

Las vacunas también pueden comprender fragmentos que comprenden un epítipo de GNA1870 en cuyo caso, la detección del epítipo en un patógeno de interés puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal frente al epítipo.

La proteína GNA1870 es un antígeno extremadamente eficaz para provocar respuestas de anticuerpos anti-meningococo y se expresa en todos los serogrupos de meningococos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos y que uno de estos se divide de nuevo para dar tres variantes en total (R13), y, aunque el suero producido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo variante, no es activo contra cepas que expresan una de las otras dos variantes, *es decir* existe una protección cruzada dentro de la variante pero no hay una protección cruzada entre variantes. A través del uso de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para una u otra variante, un experto en la técnica podría diferenciar entre estos grupos. Por tanto, para una eficacia máxima cruzada entre cepas, se prefiere que una vacuna incluya más de una variante de la proteína GNA1870 y, por lo tanto, los anticuerpos de detección correspondientes deben tener en cuenta la naturaleza de la vacuna. Por ejemplo, una composición de vacuna con uno de cada grupo probablemente tendrá al menos un anticuerpo monoclonal de cada variante para la detección.

Antígenos GNA2091. La proteína “GNA2091” del serogrupo B se divulga como proteína “936” en la referencia (R3) (SEQ ID 2883 & 2884) y como “NMB2091” en la referencia (R2) (véase también el número de acceso en GenBank GI:7227353). El correspondiente gen en el serogrupo A (R1) tiene un número de registro en GenBank 7379093.

Cuando se usa como antígeno en una vacuna, la proteína GNA2091 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de GNA2091 son variantes de truncamiento o delección, tales como las divulgadas en las referencias (R6), (R7), y (R8). En particular, el péptido líder en el extremo N de GNA2091 puede deleccionarse (*es decir*, delección de

los residuos 1 a 23 para la cepa MC58) para dar GNA2091^(NL).

Los antígenos de GNA2091 también pueden incluir variantes (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, mutantes etc.).

- 5 Las vacunas también pueden comprender fragmentos que comprenden un epítipo de GNA2091 en cuyo caso, la detección del epítipo en un patógeno de interés puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal frente al epítipo.

Antígenos GNA1030. La proteína "GNA1030" del serogrupo B se divulga como "953" en la referencia (R3) (SEQ ID 2917 y 2918) y como "NMB1030" en la referencia (R2) (véase también el número de acceso en GenBank GI:7226269). La correspondiente proteína en el serogrupo A (R1) tiene un número de registro en GenBank 7380108.

- 10 Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína GNA1030 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de GNA1030 son variantes de truncamiento o delección, tales como las divulgadas en las referencias (R6), (R7), y (R8). En particular, el péptido líder en el extremo N de 953 puede deleccionarse (*es decir*, delección de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58) para dar 953^(NL).

- 15 Los antígenos de GNA1030 también pueden incluir variantes (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, mutantes etc.). Formas alélicas de GNA1030 se muestran en la Figura 19 de la referencia (R4).

Las vacunas también pueden comprender fragmentos que comprenden un epítipo de GNA11030 en cuyo caso, la detección del epítipo en un patógeno de interés puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal frente al epítipo.

- 20 **Antígenos GNA2132.** La proteína "287" del serogrupo B se divulga como "287" en la referencia (R3) (SEQ ID 3103 y 3104) y como "NMB2132" en la referencia (R2) (véase también el número de acceso en GenBank GI:7227388). La correspondiente proteína en el serogrupo A (R1) tiene un número de registro en GenBank 7379057.

- 25 Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína GNA2132 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de GNA2132 son variantes de truncamiento o delección, tales como las divulgadas en las referencias (R6), (R7), y (R8). En particular, el extremo N de GNA2132 puede deleccionarse hasta e incluyendo su secuencia de poli-glicina (*es decir*, delección de los residuos 1 a 24 para la cepa MC58), que a veces se distingue en el presente documento por el uso de un prefijo "ΔG". Esta delección puede potenciar la expresión.

Los antígenos de GNA2132 también pueden incluir variantes (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, mutantes etc.). Las formas alélicas de GNA2132 se pueden ver en las Figuras 5 y 15 de la referencia (R4) y en el ejemplo 13 y la figura 21 de la referencia (R3) (SEC ID 3179 a 3184).

- 30 **Cepas.** Los antígenos preferidos para vacunas contra *N. meningitidis* del serogrupo B son de las cepas 2996, MC58, 95N477 y 394/98. La cepa 394/98 en ocasiones se denomina en el presente documento "NZ", ya que es una cepa de Nueva Zelanda.

Preferentemente, GNA2132 procede de la cepa 2996 o, más preferentemente, de la cepa 394/98.

- 35 Preferentemente, GNA1870 procede de las cepas del serogrupo B NC58, 2996, 394/98 o 95N477, o de la cepa del serogrupo C 90/18311. La cepa MC58 es más preferida.

Los antígenos GNA2091, GNA1030 y NadA proceden, preferentemente, de la cepa 2996.

Linajes hipervirulentos y respuestas bactericidas de antibióticos. En general, las vacunas contra *N. meningitidis* de serogrupo B podrán inducir respuestas bactericidas de anticuerpos después de su administración a un sujeto, que puede verificarse analizando en el ensayo bactericida divulgado en el presente documento.

- 40 En lugar de ofrecer una protección estrecha, las vacunas contra *N. meningitidis* de serogrupo B inducen respuestas bactericidas de anticuerpos contra más de un linaje hipervirulento del serogrupo B; sin embargo, incluso dentro de un linaje hipervirulento particular, una vacuna puede no ser eficaz contra todas las cepas en el linaje. Por lo tanto, un experto en la técnica desearía un ensayo tal como se divulga en el presente documento para determinar si una vacuna es eficaz contra una cepa de interés concreta antes de usar la vacuna.

- 45 Referencias para las vacunas contra *N. meningitidis* del serogrupo B:

- (R1) Parkhill y col., (2000) Nature 404:502–506.
- (R2) Tettelin y col., (2000) Science 287:1809–1815.
- (R3) Documento WO99/57280.
- (R4) Documento WO00/66741.
- (R5) Pizza y col., (2000) Science 287:1816–1820.
- (R6) Documento WO01/64920.
- (R7) Documento WO01/64922.

50

- (R8) Documento WO03/020756.
 (R9) Comanducci y col., (2002) J. Exp. Med. 195:1445–1454.
 (R10) Documento WO03/010194.
 (R11) Solicitud de patente del Reino Unido 0227346,4.
 (R12) Documento WO03/063766.
 (R13) Massignani y col., (2003) J Exp Med 197:789–799.

Anticuerpos bactericidas purificados o aislados

Los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento pueden usarse para evaluar la actividad bactericida de anticuerpos policlonales purificados o anticuerpos monoclonales aislados. Estos anticuerpos, si se confirma que proporcionan una actividad bactericida eficaz, se pueden utilizar para la inmunización pasiva o como vacunas terapéuticas contra patógenos bacterianos, incluyendo cualquiera de los patógenos como se ha descrito anteriormente, o como un patrón de calibración o control positivo en los ensayos bactericidas. Por otra parte, para generar tales anticuerpos policlonales o monoclonales bactericidas se puede usar cualquier vacunas y componente como se ha descrito anteriormente.

Actividad de opsonización de los anticuerpos

La determinación de la actividad antibacteriana que resulta en la destrucción de patógenos en los sujetos también se puede determinar mediante la actividad de opsonización de los anticuerpos específicos de patógenos, que da lugar a la destrucción por fagocitos. Los patógenos bacterianos como se divulga en el presente documento se pueden utilizar para evaluar la actividad de opsonización de las muestras de suero o plasma, anticuerpos policlonales purificados o anticuerpos monoclonales aislados. En el presente documento, se añade la muestra que contiene anticuerpos de la actividad de opsonización al patógeno junto con fagocitos, y en lugar de dar lugar a un complejo de ataque a la membrana, como con los anticuerpos bactericidas, el patógeno será opsonizado con anticuerpos específicos de patógenos y luego destruido por los fagocitos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos o macrófagos. El ensayo para medir la actividad de opsonización de los anticuerpos específicos de patógenos puede incluir, además, todos los componentes de la cascada del complemento o fracciones de la misma, para ayudar o permitir la opsonización del patógeno, o puede no incluir complemento, ya que los anticuerpos, tales como IgG, dependientes de patógenos pueden actuar solamente como moléculas de opsonina. El ensayo para medir la actividad de opsonización tendrá que detectar el crecimiento bacteriano sin interferencia por los fagocitos, por lo tanto, los fagocitos se puede retirar (por ejemplo, filtración o clasificación celular basada en anticuerpos) o, de otro modo, inactivarse (por ejemplo, inhibidores del crecimiento eucariótico). Como alternativa se puede usar un indicador metabólico que es específico del metabolismo bacteriano también.

Componentes del ensayo

Muestra. Típicamente, la muestra analizada en el ensayo será una muestra que tiene actividad bactericida desconocida. La muestra será generalmente de plasma o suero, o un componente de las mismas, tomada de un sujeto humano o animal que ha sido vacunado contra un patógeno bacteriano de interés. La muestra de plasma o suero, o componente de los mismos, también pueden recogerse de pacientes convalecientes o infectados, y de sujetos no vacunados, para medir el estado de la actividad bactericida de estos individuos. Otra fuente para una muestra puede ser anticuerpos policlonales aislados específicos de patógeno bacteriano o monoclonales purificados, que pueden usarse con fines profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, para analizar la actividad bactericida. Las muestras utilizadas en el ensayo se pueden diluir dos veces en los pocillos de reacción separados para generar una dilución en serie de la muestra, tal como 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, y 1:512 etc. Otras diluciones son también posibles, tal como triple o doble seguida de triple etc. Los pocillos de reacción pueden estar en placas de microtitulación con 96 pocillos por placa, preferentemente con más de 96 pocillos por placa, tal como 384 o 1536 pocillos de reacción por placa. Cada muestra diluida se puede combinar con un número o tamaño de muestra especificado de bacterias por pocillo y con complemento activo para formar una solución de reacción que resulta en la lisis de las bacterias después de un período de incubación especificado, determinado empíricamente por un experto en la técnica usando técnicas de rutina, y que, generalmente, es durante un período de 30 a 90 minutos, por un complejo de ataque a membrana que comprende complemento y anticuerpos bactericidas específicos o por la acción del complemento y las células fagocíticas, tales como neutrófilos o macrófagos. Las muestras de control adicionales se incluyen normalmente de sujetos que no han sido vacunados, así como una reacción de la muestra con complemento inactivado por calor para el control del potencial de actividad bactericida de fondo del ensayo.

Indicador metabólico. Cualquier actividad bactericida en una muestra dará lugar a la destrucción específica de las bacterias añadidas al pocillo de ensayo, por lo general en 60 minutos. Cualquier bacteria superviviente restante puede identificarse mediante su actividad metabólica usando un indicador metabólico que puede detectarse, por ejemplo, mediante la detección cromogénica o fluorescente, tal como alamarBlue (resazurina), durante una etapa de incubación adicional que permite que las bacterias que sobreviven crezcan a niveles detectables suficientes. El medio de crecimiento adicional se suministra en combinación con alamarBlue, y el medio puede ser caldo de Mueller Hinton (MH) o incluso tampón PBS de Dulbecco suplementado con glucosa. AlamarBlue es un indicador cromogénico de reducción-reducción-oxigenación (redox) y está en su estado oxigenado con un color azul. Una vez

que se ha reducido en la célula bacteriana viva, alamarBlue se vuelve de color rosa y la absorbancia se puede medir en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Un cambio de la longitud de onda de absorción óptima puede ser posible debido a una influencia cromatográfica por la solución de reacción empleada. Además, alamarBlue en el estado reducido emite una señal de fluorescencia de 590 nm después de la excitación a una longitud de onda de 530 - 560 nm, por lo que también es un indicador fluorescente. La señal colorimétrica o fluorescente producida por el indicador de reducid en las bacterias supervivientes es capturada después para medir la actividad bactericida de la muestra en lugar de contar las colonias bacterianas supervivientes. Otros ejemplos de indicadores metabólicos además de alamarBlue son indicadores colorimétricos redox, tales como OTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) 2H-tetrazolio-5-carboxanilida], MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromuro], INT [cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio] y CTC (cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio), o el indicador fluorescente ANS (ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico). Otras formas de evaluar el crecimiento bacteriano es la medición directa de la densidad óptica a 600 nm o 660 nm en el medio de crecimiento.

Medición de la supervivencia. Con el fin de medir con precisión la señal fluorescente o cromogénica del indicador metabólica para determinar el número de bacterias supervivientes, la señal se mide, preferentemente, en puntos de tiempo recurrentes a lo largo de al menos una parte de la etapa de incubación con el indicador metabólico. Los puntos de tiempo para la medición se seleccionan para optimizar la generación de datos de la señal en el intervalo lineal del indicador metabólico, mientras que el crecimiento bacteriano está en su fase log y que esos datos por debajo del intervalo lineal o mayor en la fase saturada pueden excluirse. Dado que las muestras utilizadas para determinar la actividad bactericida generalmente se analizaron por primera vez, normalmente el título de anticuerpos bactericidas será desconocido y en tal situación pueden variar considerablemente. También hay una posible diferencia dependiente de patógeno bacteriano en las propiedades de crecimiento, ya que el tiempo de generación varía entre las diferentes bacterias. Por lo tanto, los puntos de tiempo deseados dentro del alcance de la señal lineal del indicador metabólico y la fase log del patógeno pueden variar en función de la actividad bactericida de las propiedades de la muestra y las propiedades de crecimiento del patógeno. Se descubrió que el desarrollo de la señal para una cepa MenB, tal como NZ98/254 estaba tanto en el intervalo lineal de AlamarBlue como en la fase log para las bacterias entre cinco a siete horas de incubación (figura 5) a un inóculo de partida de 500 células por pocillo. Puesto que cada experimento puede tener diferentes condiciones, los tiempos de medición pueden ser cada hora, o fracciones de la misma, por ejemplo, cada 5 minutos, 10 minutos, 1 hora, 2 horas, etc., cada hora hasta 8 horas, hasta 24 horas, 48 horas o 96 horas y más allá. En consecuencia, el período de tiempo óptimo puede determinarlo empíricamente un experto en la técnica usando técnicas estándar. Para permitir las condiciones de reacción óptimas, las placas se sellan, preferentemente, que puede ser con un sello óptico para cubrir así la reacción y permitir mediciones colorimétricas y fluorescentes recurrentes durante el tiempo de incubación. No solo se redujo drásticamente el riesgo de contaminación cruzada de la muestra, sino que también se evitan la evaporación y, por lo tanto el impacto de las condiciones de crecimiento, incluyendo la afectación al metabolismo indicador. Esto puede ser importante con tiempos de incubación más largos y permite una mayor flexibilidad y una mayor precisión entre ensayos y entre operadores con este ensayo, que son factores deseables para un ensayo de EBC de alto rendimiento.

Evaluación de la actividad bactericida. Mediante la recopilación de las señales medidas desde el indicador metabólico durante un transcurso de tiempo que implica mediciones recurrentes, se puede determinar el intervalo lineal para el ensayo y el patógeno en particular. La siguiente etapa incluye la determinación de la relación de señal - ruido más alta dentro del intervalo de medición lineal. Por ejemplo, cuando la señal de fluorescencia generada por el crecimiento bacteriano alcanza el valor de 80 % de la meseta de la señal, dicho punto de tiempo particular todavía estaría dentro del intervalo de medición lineal al tiempo que da una relación señal-ruido significativamente alta. Mediante el establecimiento de una señal en porcentaje del valor máximo predeterminada dentro del intervalo lineal para todos los ensayos, se puede corregir la variabilidad entre ensayos, incluyendo las variaciones de cepas. Este porcentaje puede estar en cualquier lugar entre el 1 % y el 99 % de la meseta de la señal, preferentemente en el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, más preferentemente entre el 50 % y el 80 %, y, lo más preferentemente, lo más alto posible, pero todavía dentro del intervalo lineal de la señal. Si se utilizan muestras de suero, se puede incluir una etapa de normalización adicional para corregir por una pérdida de la señal de fluorescencia del indicador AlamarBlue a concentraciones en suero altas. Los valores en bruto de una muestra de ensayo con el complemento activo pueden dividirse por una serie de dilución del complemento inactivado por calor correspondiente. A continuación, los valores normalizados resultantes se pueden utilizar para el cálculo del título, después de la implementación del ajuste de curva usando un modelo logístico de cuatro parámetros (por ejemplo, 4PL). Los títulos bactericidas finales pueden definirse como la dilución de la muestra recíproca de la CI_{50} (concentración inhibidora) que da lugar al 50 % de la población de bacterias supervivientes. Esta población de bacterias se calcula, después de la etapa de incubación de duración predeterminada para alcanzar el intervalo de la señal lineal del indicador metabólico, como la proporción relativa del número de bacterias supervivientes que están presentes antes del inicio de la reacción bactericida ($t = 0$ min) y después de la reacción bactericida (generalmente $t = 30$ a 90 min). Como alternativa se incubaba un cultivo de control sin anticuerpos bactericidas para la misma longitud que la reacción bactericida (en general, $t = 30$ a 90 min) y después se exponen a la misma etapa de incubación de una longitud predeterminada para medir el crecimiento de

bacterias supervivientes en el intervalo lineal.

Kits

- 5 Los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento pueden ser incluirse en un kit para la práctica de los ensayos. En un aspecto, los kits para su uso en los procedimientos y composiciones como se divulgan en el presente documento pueden incluir (a) una cantidad del patógeno de interés, (b) una cantidad de complemento activo o inactivo, (c) un medio líquido para mantener el crecimiento del patógeno, (d) un indicador metabólico, (e) un anticuerpo estándar con actividad bactericida conocida, (f) una muestra de anticuerpo con actividad bactericida conocida o desconocida.

Aspectos generales

- 10 El término “que comprende” abarca (que incluye” además de “constituido por”, *por ejemplo* una composición “que comprende” X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

- 15 La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, *por ejemplo*, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención. El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, dos componentes se pueden combinar entre sí y, después, la combinación puede combinarse con el tercer componente, *etc.*

- 20 Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deberán obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EST) y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

- 25 Cuando se administra un compuesto al organismo como parte de una composición, dicho compuesto puede sustituirse de forma alternativa por un fármaco adecuado.

Cuando se utiliza un sustrato de células para reordenar o invertir los procedimientos de genética, es preferentemente uno que ha sido aprobado para uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, como en la Farmacopea Europea, capítulo general 5.2.3.

- 30 La identidad entre secuencias polipeptídicas se determina, preferentemente, con el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización por hueco abierto= 12 y penalización por extensión de hueco= 1.

Ejemplo

Ejemplo 1

- 35 **Comparación de los títulos bactericidas contra diferentes cepas de *N. meningitidis* mediante el uso de lecturas convencionales y de fluorescencia**

Resumen. Este ejemplo demuestra la correlación entre el ensayo bactericida estándar y el fluorescente (EBC).

- 40 *Ensayo bactericida estándar.* El ensayo bactericida estándar se realizó del siguiente modo: los sueros de ensayo de sujetos humanos vacunados con proteína recombinante de MenB+/- VME y de individuos no vacunados se diluyeron manualmente dos veces de 1: 2 a 1: 512 en una placa de microtitulación de 96 pocillos. El volumen de reacción total para el ensayo fue de 80 μ l, que consiste en 40 μ l de suero de ensayo diluido, 20 μ l de complemento activo y 20 μ l de bacterias diluidas ($1,3 \times 10^4$ células/ml). La reacción se incubó en 5 % de CO₂ a 37 °C durante 1 hora ($t = 60$ en el momento de la finalización). Las reacciones a $t = 60$, así como los controles a $t = 0$ se sembraron mediante el procedimiento de difusión e inclinación por duplicado sobre las placas de agar y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. A continuación se contaron las colonias para determinar las UFC y el título se calculó como la dilución recíproca al 50 % de destrucción.

- 50 *Ensayo bactericida fluorescente automático.* La dilución en serie automática de sueros de ensayo humanos de individuos vacunados y no vacunados se realizó durante un intervalo de 1:2 a 1:512 en una placa de microtitulación de 384 pocillos, seguido de dispersión automática de bacterias y complemento hasta un volumen de ensayo final de 20 μ l que consiste en 10 μ l de suero de ensayo diluido, 5 μ l de complemento activo y 5 μ l de bacterias (1×10^5 células/ml). Después de una 1 hora de incubación a 37 °C en 5 % de CO₂, 20 μ l de la mezcla de desarrollo sin agarosa (20 μ l de caldo MH + 15 % de AlamarBlue) se dispensó automáticamente en cada pocillo. A continuación, la placa se cerró con un sello de plástico ópticamente transparente y se incubó durante la noche, mientras que la señal

de fluorescencia se midió automáticamente cada hora para asegurar que la tasa de crecimiento de bacterias alcanzaba el valor el 90 % de la meseta de la señal dentro del intervalo de medición lineal para una relación señal - ruido más alta. Después de la normalización de la señal con suero humano sin actividad bactericida detectable y ajuste de la curva, el título se calculó como la dilución recíproca de la CI_{50} , definida como el 50 % de la población superviviente a una incubación de $t = 60$ minutos de las bacterias con sueros y complemento.

Resultados y conclusiones. Se ha demostrado que el (HT)–EBC de alto rendimiento funcional igual de bien en la determinación del título que el EBC tradicional en estudios en los que las mismas muestras de ensayo clínico se analizan en paralelo utilizando los mismos factores de dilución de los sueros de la muestra para ambos ensayos. Las Figuras 1-4 demuestran la buena correlación entre los ensayos bactericidas estándar y fluorescente contra diferentes cepas del serogrupo B de *N. meningitidis* (NZ98-254, 44/76-SL, y 5-99; véase también la figura 6 para la cepa de MenB NZ98-254). Además, la figura 4 representa los títulos de la media geométrica calculada para los sueros después de la vacunación que eran 191 para la lectura basada en agar y 173 usando el procedimiento de lectura basado en la fluorescencia. Asimismo, cinco de los seis sueros preinmunes mostraron títulos de <4 en ambos ensayos.

Ejemplo 2

Optimización del ensayo

Desarrollo de la señal. En la primera etapa se generó una curva de crecimiento bacteriano representando los cambios de la señal de fluorescencia en un intervalo de tiempo de no detectable del crecimiento bacteriano de la cepa NZ98/254 de *Neisseria meningitidis* de serogrupo hasta el punto de tiempo en el que se alcanzó saturación de crecimiento bacteriano. El EBC fluorescente se realizó como se ha descrito anteriormente, usando sueros de ensayo de sujetos humanos vacunados con la proteína recombinante MenB +/- VME y de individuo no vacunados. Se realizó un total de siete experimentos independientes y los datos de los puntos de tiempo cada hora a partir de 4 horas hasta 9 horas se utilizaron para un análisis posterior (Figura 5).

Determinación del punto de tiempo. La Figura 6 ilustra que la determinación del título de anticuerpos bactericidas se debe tomar cuando la señal de fluorescencia es una medida lineal del número de bacterias. Sobre la base de la curva de crecimiento (figura 5), cabría esperar que el tiempo fuera de 5 a 7 horas después de la reacción bactericida. Como alternativa, se puede elegir un punto de tiempo para cada experimento individual. Por ejemplo, cuando la señal de fluorescencia generada por el crecimiento bacteriano alcanza el valor de 90 % de la meseta de la señal, dicho punto de tiempo particular todavía estaría dentro del intervalo de medición lineal al tiempo que da una relación señal-ruido significativamente más alta. También se ha incluido el análisis de la correlación contra el título calculado en puntos de tiempo cuando las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) son ~ 90 % del valor máximo (Tabla 1)

Tabla 1

Análisis de la correlación contra el título calculado en los puntos de tiempo posteriores a la reacción bactericida cuando la UAF es ~ 90 % de la meseta de la señal máxima.			
$y = a + b \cdot x$			
Tiempo	A	b	R2
4	0,039	0,133	0,045
5	0,117	1,024	0,932
6	0,160	0,992	0,950
7	0,198	0,909	0,934
8	0,240	0,813	0,927
9	0,103	0,793	0,945
UAF	0,187	0,907	0,935

Efecto del suero. Dado que la señal de fluorescencia se somete a inactivación o se reduce de otro modo mediante concentración sérica elevada, los valores brutos de la muestra de ensayo DU02-01052 con complemento activo se dividieron por las correspondientes series de dilución del complemento inactivado con calor. Los valores normalizados resultantes se utilizaron a continuación para el cálculo del título. Después de la normalización de los datos para eliminar el efecto del suero, los títulos resultantes del procedimiento de lectura fluorescente mostraron una buena correlación con los títulos resultantes del procedimiento de lectura estándar (Figura 7).

Ejemplo 3

Análisis de datos

Procedimiento de normalización. Para el experimento de cada día, los controles de normalización de suero se pasan por triplicado en cada punto de dilución. Como se ha indicado anteriormente, se observaron concentraciones elevadas en suero para inhibir la señal fluorescente de AlamarBlue. Por lo tanto, se usó un suero que se calentó para inactivar el complemento para normalizar la señal para corregir dicha inactivación u otra pérdida de señal. Si el suero que se estaba usando como la fuente de complemento para el experimento era de la misma especie que los sueros experimental, dicho suero podría también usarse para la normalización. Por tanto, estaba presente en las mezclas de reacción para dos propósitos diferentes. En un caso, el suero estaba presente como la fuente de complemento a una concentración constante (en cuyo caso el suero no se inactivó con calor). En el otro caso, el suero estaba presente en un grupo separado de reacciones como el control de la normalización en el que el suero se calentó para inactivar el complemento y en forma de dilución en serie coincidente con las diluciones en serie de los sueros experimentales para los que estaba sirviendo como control de la normalización. Sin embargo, si el suero fuente de complemento era de una especie diferente que el suero experimental, se habría usado un suero separado de la misma especie que los sueros experimentales para cumplir la función del control de normalización en suero de la dilución en serie inactivado por calor.

Los controles con el complemento inactivado por calor se diluyeron por los mismos factores de dilución que la muestra experimental y se midieron en los mismos puntos de tiempo. Se computó un factor de normalización para cada punto de tiempo para cada dilución mediante la mediana de las UAF por triplicado. El valor UAF para cada suero de ensayo se dividió por el factor de normalización para el correspondiente punto de tiempo y dilución del control de normalización. Esto colocó los valores normalizados para los sueros de ensayo sin actividad destructora alguna cerca de 1,0. Si una muestra de ensayo tenía que diluirse previamente debido al título muy elevado, de modo que no había control de la normalización de suero a una dilución correspondiente, se utilizó el factor para la dilución más alta que estaba disponible en su lugar.

Procedimiento de ajuste de la curva. Una curva logística de cuatro parámetros, que se describe por la ecuación siguiente, se ajustó a la concentración del suero de ensayo (en relación con el suero puro) y los datos de respuesta. La parte inferior de la curva se restringió a entre 0 y 0,15, la parte superior de la curva se restringió a entre 0,8 y 1,5, y la pendiente de Hill se restringió a entre -3,0 y +3,0.

$$\text{respuesta} = \frac{\text{inferior} + \frac{\text{superior} - \text{inferior}}{1 + \left(\frac{\text{concentración}}{\text{IC}_{50}}\right)^{\text{pendiente}}}}{1}$$

Curvas de crecimiento. La señal observada en los ensayos fue la composición de varias funciones de respuesta. La actividad bactericida del anticuerpo con respecto a la concentración de anticuerpo, el crecimiento de bacterias con el tiempo a medida que saturan el medio de crecimiento, y el metabolismo de alamarBlue a medida que se agota de los medios fueron todos ellos funciones sigmoideas. Era importante inspeccionar las curvas de "crecimiento", tal como se determina mediante los controles sobre el transcurso del tiempo, para asegurar que el punto de tiempo elegido para la determinación de la CI_{50} se produjo cerca de la parte más inclinada de la curva de crecimiento.

Para la determinación del punto de tiempo, es importante utilizar el punto de tiempo cuando las bacterias de control aún están creciendo rápidamente y la señal del indicador metabólico todavía está cambiando. Si la señal ya no está cambiando, hay una serie de razones posibles. El cultivo puede no estar creciendo ya; la señal del indicador metabólica podría estar saturada; o el cultivo puede haberse quedado sin indicador metabólico que metabolizar, a pesar de que las propias bacterias todavía están creciendo.

En un sistema que utiliza sueros humanos, la señal fluorescente cambió rápidamente hasta que de repente alcanzó la saturación (o agotamiento del suministro de AlamarBlue para metabolizar). Debido a esta forma de la curva de crecimiento, un buen punto de tiempo para la determinación de la CI_{50} fue la última lectura antes de la señal que cruzó el 90 % de su valor máximo. En otros sistemas, la combinación de la cepa bacteriana y la fuente de complemento no humano mostraron una curva de crecimiento en la que la señal se reduce gradualmente en lugar de repentinamente cuando se aproxima a la saturación. Para tales sistemas, los criterios del 90 % no eran adecuados, ya que el último punto de tiempo antes del 90 % del máximo ya estaba comenzando a mostrar una saturación sustancial, y, por lo tanto, no era adecuado. En tal caso, se aplicó una heurística diferente. Se identificó el intervalo entre dos lecturas consecutivas en el que la señal ha aumentado más y la última de las dos lecturas consecutivas se usó como el punto de tiempo para la determinación de la CI_{50} .

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de alto rendimiento de evaluación de la actividad bactericida de una muestra, que comprende:
 - (a) proporcionar un fluido no gel sellado, que comprende una cantidad de un patógeno, una muestra, un potenciador y un indicador metabólico, en el que el patógeno, la muestra y el potenciador se han incubado durante un período de tiempo suficiente para que la muestra mate a un parte del patógeno si la muestra comprende actividad bactericida o de opsonización; (b) medir el indicador metabólico en tres o más puntos de tiempo durante una segunda incubación; y (c) evaluar la actividad bactericida usando las medidas en los tres o más puntos de tiempo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el indicador metabólico es un compuesto cromógeno o un compuesto fluorescente, por ejemplo resazurina, por ejemplo AlamarBlue.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el patógeno se selecciona del grupo que consiste en *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza B*, *H. pylori*, *E. coli* asociada con meningitis/sepsis, *Haemophilus influenzae*, no tipificable y *E. coli* uropatógena.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el potenciador es el complemento cuando se analiza la actividad bactericida o células fagocíticas y, opcionalmente, el complemento cuando se analiza la actividad de opsonización.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que las células fagocíticas son neutrófilos o macrófagos, opcionalmente en el que las células fagocíticas se inactivan o eliminan del fluido antes de la segunda incubación.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que el indicador metabólico no responde a la actividad metabólica de las células fagocíticas.
7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el complemento es:
 - (i) complemento activo, por ejemplo en el que dicho complemento activo deriva del grupo que consiste en ser humano, conejo, cría de conejo, otro origen animal o recombinante; o
 - (ii) inactivo.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho fluido no gel no contiene agarosa ni ningún otro agente gelificante usado para formar una superficie de crecimiento sólida para las bacterias.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho fluido sellado se sella:
 - (i) antes de la incubación del patógeno y la muestra y las mediciones para evitar la evaporación de dicho fluido; o
 - (ii) después la incubación del patógeno y la muestra y las mediciones para evitar la evaporación de dicho fluido;opcionalmente en el que dicho sellado comprende un sello ópticamente transparente para realizar mediciones colorimétricas y/o fluorimétricas sin la retirada de dicho sello.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha muestra es un anticuerpo aislado, suero o plasma de origen humano o animal, por ejemplo en el que dicha muestra de suero o plasma es de un sujeto al que se ha inoculado una vacuna, un candidato a vacuna o un componente de vacuna dirigido contra el patógeno, por ejemplo en el que la vacuna, el candidato a vacuna o el componente de vacuna comprende uno o más de un antígeno GNA1870, un antígeno GNA2132 y un antígeno de NadA.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicha muestra es:
 - (i) un anticuerpo aislado; o
 - (ii) un anticuerpo recombinante.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además al menos dos fluidos no gel, en el que el segundo fluido no gel comprende una dilución de la muestra en el primer fluido no gel, por ejemplo en el que la dilución puede ser doble, triple o cuádruple, o una etapa de dilución repetitiva de dilución doble seguida de dilución doble, dilución doble seguida de dilución triple, dilución triple seguida de dilución triple, dilución cuádruple seguida de dilución cuádruple.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que al menos dos fluidos no gel se incuban y se miden en placas de microtitulación seleccionadas del grupo que consiste en 96, 384 y 1536 pocillos de reacción por placa, por ejemplo en el que dichas placas de microtitulación tienen al menos 384 pocillos de reacción por placa o al menos 96 pocillos de reacción por placa.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dicha medición comprende lecturas

repetidas de dichas muestras en los puntos de tiempo predeterminados para la determinación de un título de anticuerpos bactericidas, por ejemplo en el que dichos puntos de tiempo predeterminados se seleccionan del grupo que consiste en cada minuto, cada hora y fracciones de la misma.

5 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14, en el que al menos tres de dichos puntos de tiempo medidos están en el intervalo de medición lineal del indicador metabólico para medir el crecimiento del patógeno, opcionalmente en el que dichas mediciones son señales de fluorescencia que representan el crecimiento bacteriano.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que:

10 (i) la relación señal - ruido más alta de aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % de la meseta de la señal de fluorescencia está dentro del intervalo de la medición lineal del indicador metabólico para medir el crecimiento del patógeno; o
(ii) dicha relación señal - ruido puede estar en cualquier lugar entre 1 % y 99 % de la meseta de la señal de fluorescencia.

15 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que dicha etapa de evaluación puede comprender la optimización del ensayo, por ejemplo en el que dicha optimización del ensayo comprende a) el desarrollo de la señal usando una curva de crecimiento bacteriana, b) la determinación del punto de tiempo para la relación señal-ruido óptima, y, en su caso, c) la corrección de la pérdida de señal a concentración sérica alta mediante la normalización con controles que contienen complemento inactivado, en el que opcionalmente las etapas a) a c) están completamente automatizadas, y, además en el que opcionalmente la variabilidad entre operadores del ensayo completamente automatizado se reduce en comparación con un ensayo bactericida tradicional.

18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el número de muestras procesadas por un solo operador dentro de un período de tiempo predeterminado en comparación con el ensayo bactericida tradicional se multiplica al menos por tres.

25 19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que dicha etapa de evaluación comprende corregir la pérdida de señal a una concentración sérica alta mediante la normalización con un control que contiene el complemento inactivado a una concentración aproximadamente igual a la de la muestra.

30 20. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicha etapa de evaluación comprende la corrección de la pérdida de señal a concentración sérica alta mediante la normalización con al menos dos controles que contienen complemento inactivado, en el que el segundo control comprende una dilución del primer control que es igual a la dilución del segundo fluido desde el primer fluido.

21. Un kit para poner en práctica cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el kit incluye (a) una cantidad del patógeno de interés, (b) una cantidad del complemento activo o inactivo, (c) un medio líquido para mantener el crecimiento del patógeno, (d) un indicador metabólico, (e) un anticuerpo estándar con actividad bactericida conocida, (f) una muestra de anticuerpo con actividad bactericida conocida o desconocida.

35 22. Un procedimiento implementado por ordenador para determinar una actividad bactericida de una muestra hacia un patógeno, que comprende:

40 (a) obtener, utilizando un procesador, un conjunto de tres o más mediciones de los indicadores metabólicos tomadas en un punto de tiempo de incubación establecido a partir de una serie de diluciones de los cultivos de incubación, en el que los cultivos de incubación comprenden una cantidad del patógeno, complemento, y un indicador metabólico y en el que cada uno de los cultivos de incubación comprenden además una cantidad diferente de la muestra sobre la base de una serie de diluciones predeterminada, en el que el punto de tiempo de la incubación establecido corresponde a un momento en que el patógeno está creciendo rápidamente en un cultivo de incubación sin actividad bactericida;

45 (b) obtener, usando el procesador, un conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos tomadas en el punto de tiempo de incubación establecido a partir de una serie de diluciones de los cultivos de incubación de normalización, en el que la serie de diluciones de los cultivos de incubación de normalización corresponde a la serie de diluciones de los cultivos de incubación, excepto que la serie de diluciones de la incubación de normalización no comprende ninguna actividad bactericida;

50 (c) normalizar, utilizando el procesador, el conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos utilizando el conjunto de mediciones de la normalización para producir un conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos normalizadas; y

(d) determinar, usando el procesador, la actividad bactericida de la muestra por ajuste de una curva sigmoideal al conjunto de mediciones de los indicadores metabólicos normalizadas para determinar la dilución a la que se produce la inhibición del crecimiento semimáxima.

55

23. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 22, en el que el punto de tiempo de incubación establecido se determina usando el procesador, mediante la identificación en una curva de crecimiento de un cultivo de incubación sin actividad bactericida:

- 5 (i) los dos puntos de tiempo en la curva de crecimiento entre los cuales la medición del indicador metabólico aumenta es el más grande y el establecimiento del punto de tiempo de incubación establecido es el último de los dos puntos de tiempo; o
- (ii) la meseta de saturación de las mediciones de los indicadores metabólicos y ajuste del punto de tiempo de incubación establecido para que sea el tiempo de la curva de crecimiento en que la medición de indicadores metabólicos está entre el 30 % y el 90 % de la meseta de saturación.

10

FIGURA 1

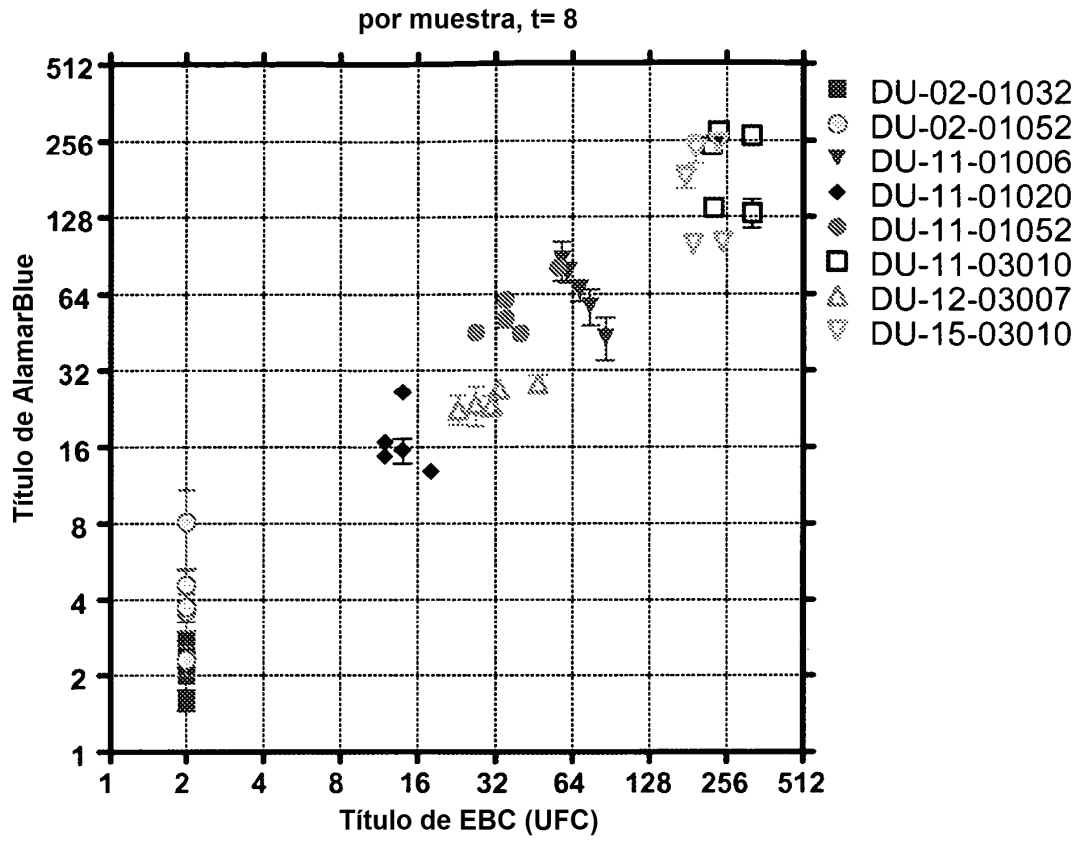


FIGURA 2

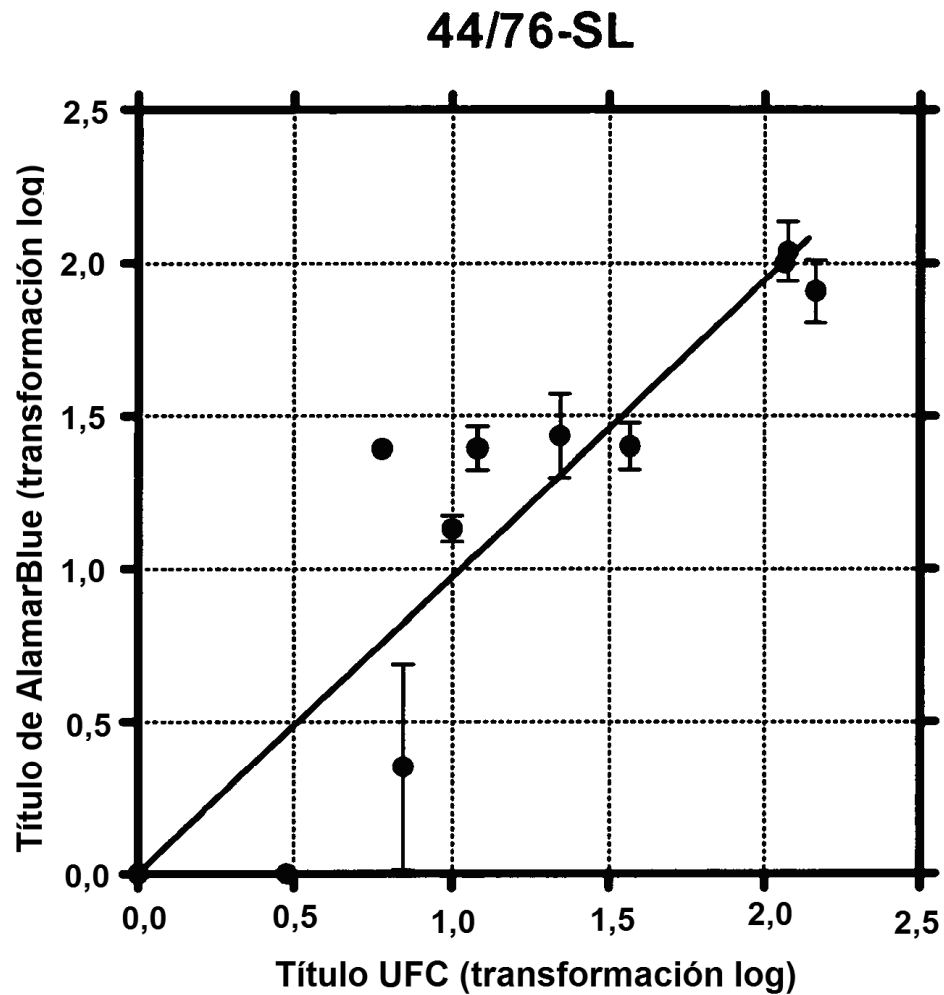
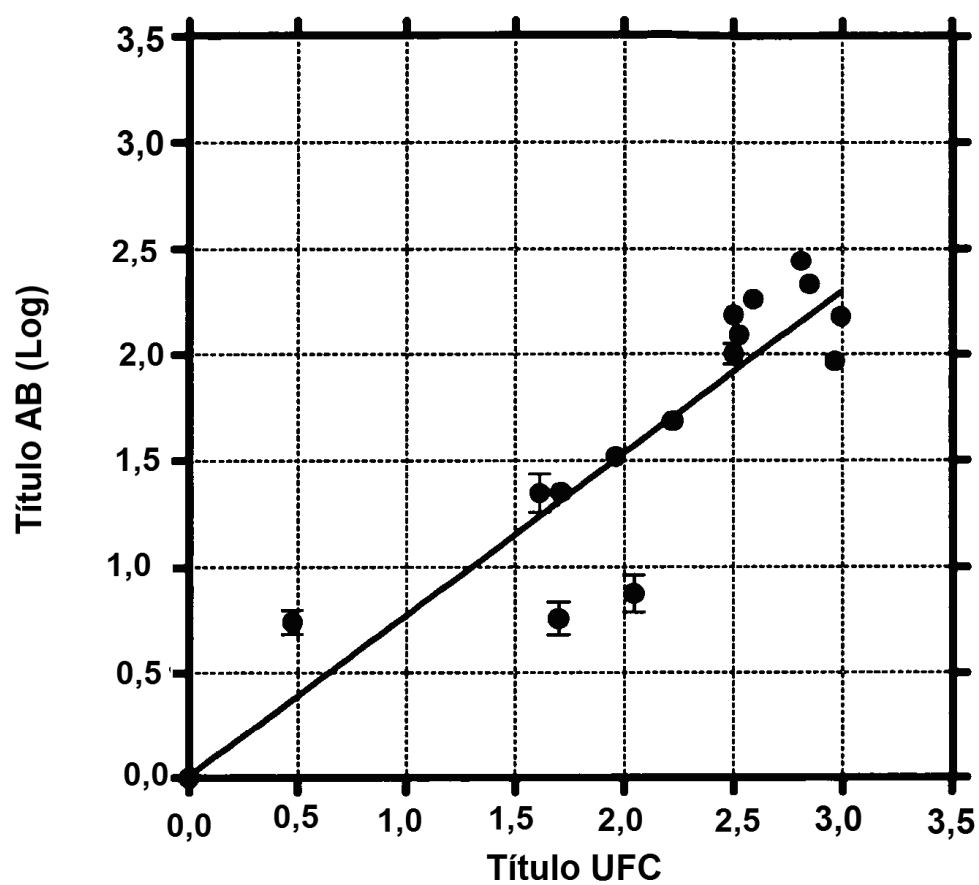


FIGURA 3

5-99



Tiempo	UAF 90 %
Pendiente	0,7634 ± 0,02642
Intersección Y cuando X= 0,0	0,008342 ± 0,05067
R cuadrada	0,9301

FIGURA 4

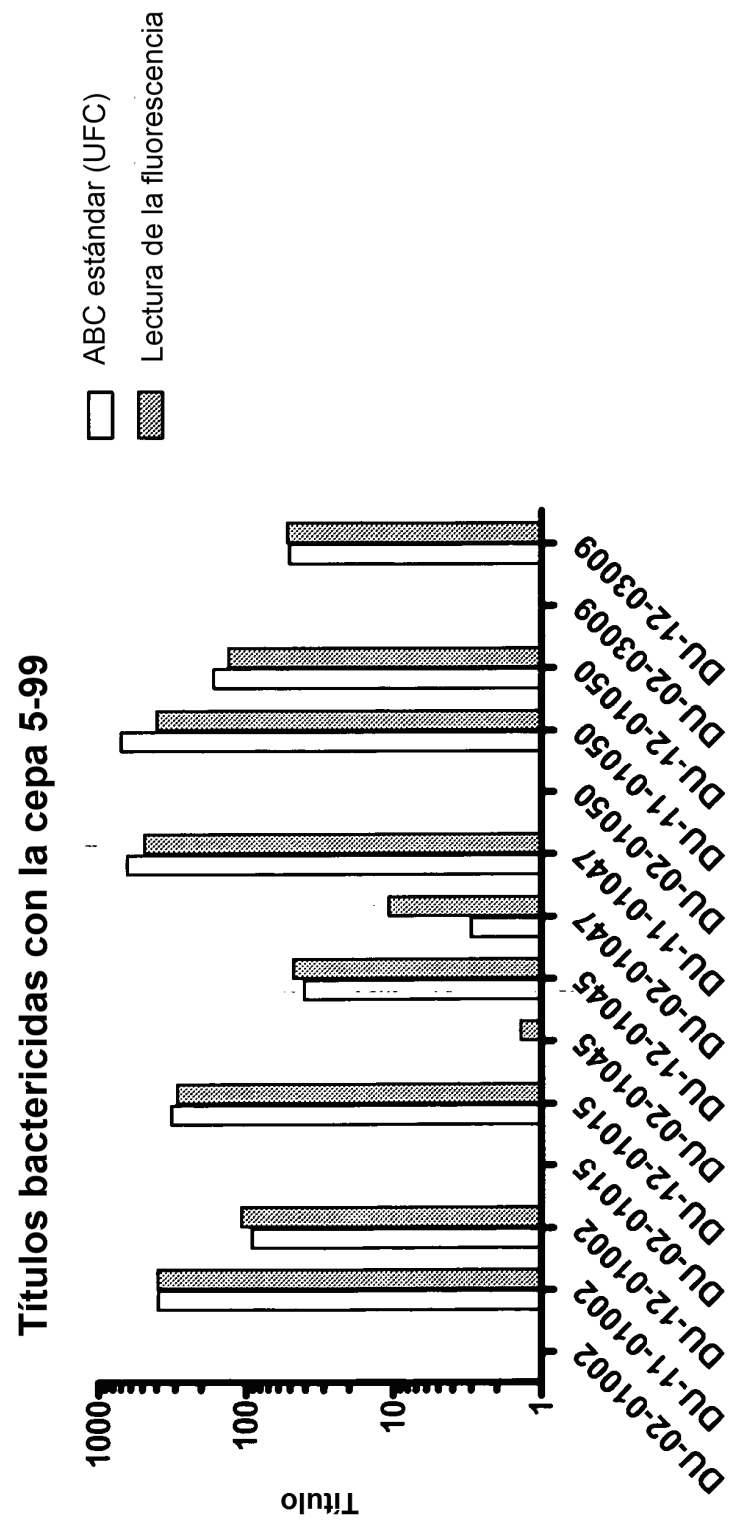


FIGURA 5

Curva de crecimiento por fechas

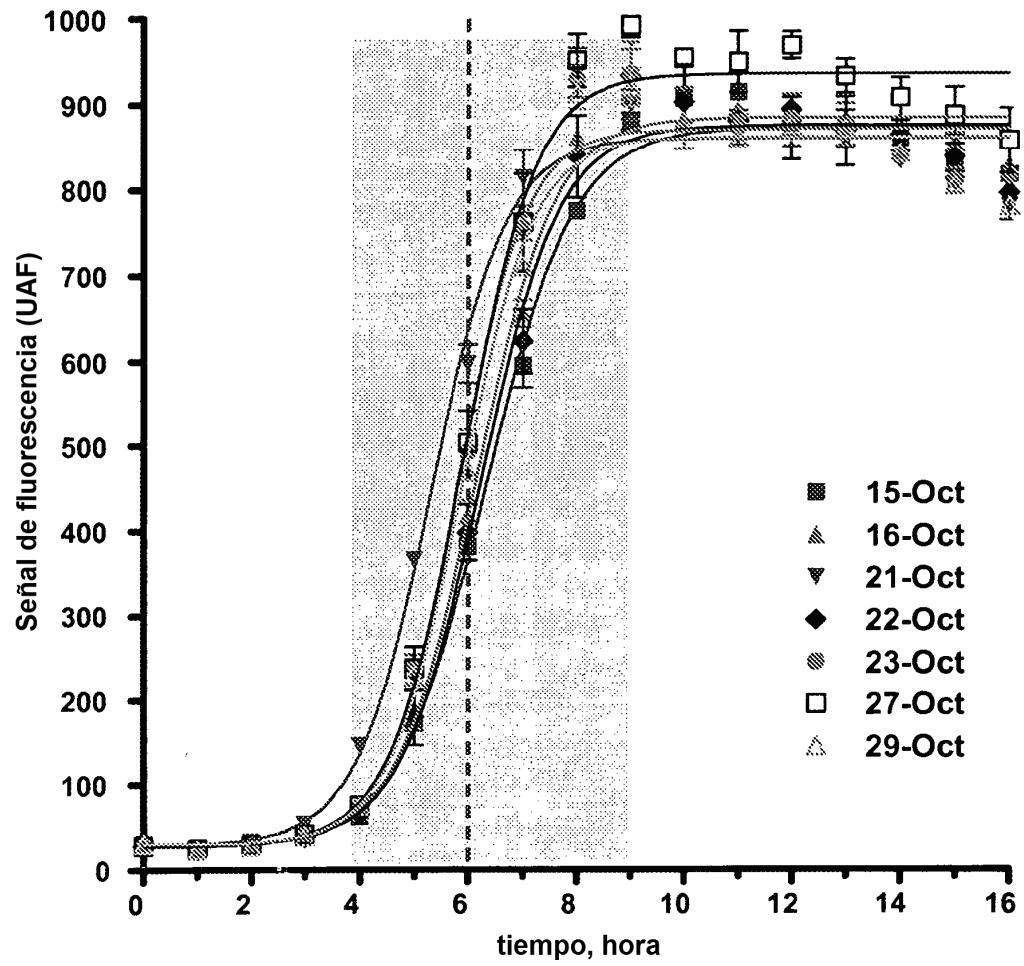


FIGURA 6

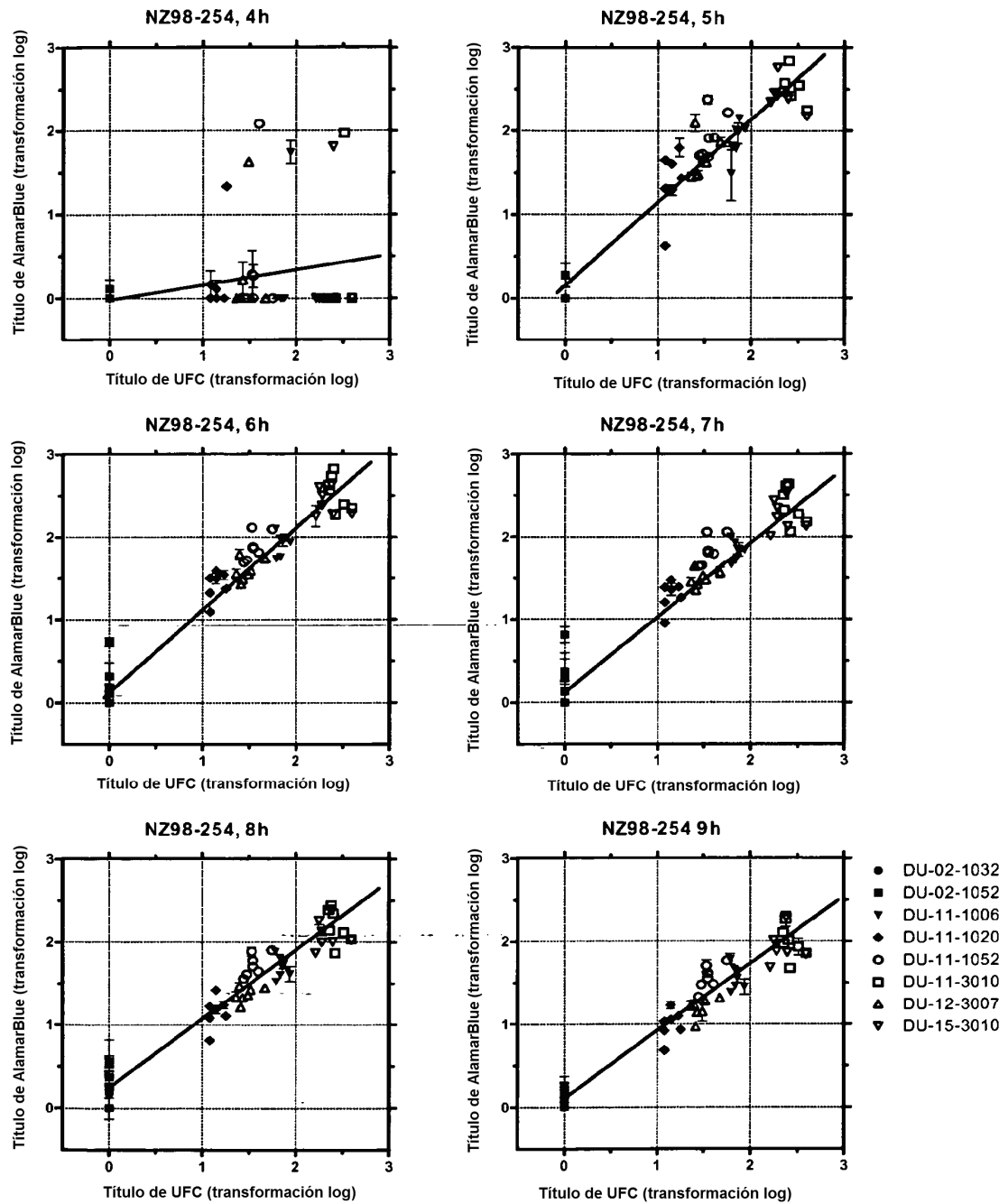


FIGURA 7

