

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 003**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2011 PCT/EP2011/052593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011 E 11708424 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2539713**

54 Título: **Procedimiento y sistema para el diagnóstico de enfermedades mediante la detección simultánea de anticuerpos unidos a sustratos sintéticos y celulares**

30 Prioridad:

22.02.2010 EP 10075079

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

13.02.2017

73 Titular/es:

**MEDIPAN GMBH (100.0%)
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Dahlewitz/Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**KNÜTTER, ILKA;
RADAU, BORIS y
ROGGENBUCK, DIRK**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 601 003 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y sistema para el diagnóstico de enfermedades mediante la detección simultánea de anticuerpos unidos a sustratos sintéticos y celulares.

5

La invención se refiere a un procedimiento y a un sistema para el diagnóstico de enfermedades que detecta simultáneamente anticuerpos unidos a sustratos celulares y/o tisulares y anticuerpos unidos a sustratos sintéticos, tales como micropartículas o perlas revestidas con antígenos específicos, proporcionando de esta manera un procedimiento en "una etapa" para la detección y caracterización simultáneas de anticuerpos asociados con enfermedades tanto a baja especificidad (celular y/o tisular) como a alta especificidad (antigénica).

10

Antecedentes de la invención

En diagnósticos rutinarios se ha establecido la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) empleando diferentes sustratos celulares y tisulares como fuentes de antígeno múltiples. Los ensayos de inmunofluorescencia basados en células, tales como la detección de anticuerpos antinucleares (AAN) usando células HEp-2, se usan ampliamente en diagnósticos clínicos y en investigación como referencia en el sector (Tan EM, Adv. Immunology 1982; 33: 167-240, Costes SV, y col., Radiat Res. 2006; 165(5): 505-15, Sack U, y col., Ann N Y Acad Sci 2009; 1173: 166-73, Conrad K, y col., Ann N Y Acad Sci 2009; 1173: 180-185). Los procedimientos para diagnosticar enfermedades autoinmunitarias que usan estrategias basadas en inmunofluorescencia indirecta se conocen en la técnica. El documento WO 97/06440 describe un procedimiento mediante el cual se diagnostica artritis reumatoide mediante la presencia de anticuerpos que están dirigidos contra centros organizadores de microtúbulos, o microtúbulos que se extienden desde estos, en una muestra de líquido corporal de un paciente. La línea celular usada como sustrato es, preferentemente, una línea celular de macrófago IT-1, que se usa como sustrato al que se unen los autoanticuerpos presentes en la muestra del paciente.

15

La demanda creciente de lectura e interpretación de patrones de fluorescencia automatizadas, que den como resultado una mejor normalización y rentabilidad, ha sido posible gracias a un sofisticado software de reconocimiento de patrones y a lectores totalmente automáticos que ya están disponibles en la actualidad (Hou YN, y col., Radiat Res. 2009; 171(3): 360-7, Hiemann R, y col., Ann N Y Acad Sci 2007; 1109: 358-71, Böcker W, y col., Radiat Res. 2006; 165(1): 113-24, Hiemann R, y col., Autoimmun Rev. 2009; 9: 17-22). La inmunofluorescencia indirecta se ha aplicado adicionalmente en enfoques cuantitativos y semicuantitativos para determinar el valor cuantitativo de anticuerpos, por ejemplo en el diagnóstico de enfermedades caracterizadas por la presencia y/o cantidad de autoanticuerpos (documento WO 2009/062479 A2).

20

Sin embargo, avances realizados en el desarrollo de ensayos y la tecnología recombinante han preparado el camino para la detección de especificidades de autoanticuerpos contra dianas antigénicas individuales mejorando de esta manera el poder de diagnóstico de los ensayos con anticuerpos. La creciente variedad de anticuerpos descubiertos en diferentes trastornos, tales como enfermedades infecciosas y reumáticas, ha generado la necesidad de técnicas innovadoras, que superen los inconvenientes de la detección de anticuerpos únicos y que disminuyan el coste y el tiempo de presentación de resultados. Por consiguiente, recientemente se han desarrollado plataformas múltiples para atender la demanda de determinaciones simultáneas de diversas especificidades de anticuerpos en una muestra. Ensayos múltiples basados en citometría de flujo basada en perlas fluorescentes y los sistemas de micromatrices han demostrado ser herramientas poderosas que dan soporte a análisis de mayor rendimiento y a ensayos más exhaustivos de las muestras de pacientes (Avaniss-Aghajani E, y col., Clin Vaccine Immunol. 2007; 14: 505-9, Lal G, y col., J Immunol Methods 2005; 296: 135-47). También se ha usado reconocimiento de patrones asistido por ordenador para analizar matrices de antígenos, de modo que los anticuerpos que se unen a un panel de antígenos asociados a una enfermedad puedan ser detectados y correlacionados con el diagnóstico de una enfermedad particular (Binder SR y col, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, diciembre de 2005, 1353-1357). Además, para la evaluación de anticuerpos específicos de enfermedades reumáticas, puede usarse detección múltiple mediante micropelotas codificadas por fluorescencia inmovilizadas, usando fluorescencia multicolor. Estos análisis de fluorescencia multicolor con algoritmos de detección de patrones proporcionan una técnica de plataforma común para el cribado de AAN (Großmann K, y col., Cytometry A. febrero de 2011; 79(2): 118-25).

35

40

45

50

Como ejemplo, los autoanticuerpos (AAC) específicos de enfermedades, son un fenómeno serológico de afecciones reumáticas sistémicas y trastornos hepáticos autoinmunitarios. En particular, la detección de AAN por IFI fue una de las primeras técnicas disponibles en laboratorios habituales para el diagnóstico serológico de enfermedades reumáticas sistémicas. A pesar del desarrollo del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y de las tecnologías de formación de complejos múltiples para la detección de AAC específicos de enfermedades, la

55

detección de AAN por ensayos de IFI sigue siendo el procedimiento de referencia en la estrategia actual de diagnóstico multifase. Pueden proporcionarse antígenos recombinantes o purificados sobre perlas, que son analizadas posteriormente en busca de anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos seleccionados usando inmunoensayos enzimáticos. Dichas estrategias muestran, sin embargo, desventajas significativas, debido a sensibilidades y especificidades fuertemente diferentes entre diferentes antígenos (Hayashi N, y col, 2001, *Clinical Chemistry*, 47: 9 1649-1659). Se han publicado ensayos fluorescentes basados en perlas múltiples que muestran una correlación razonable con procedimientos de diagnóstico con autoanticuerpos basados en células (Smith J, y col, 2005, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1050: 286-294), aunque la baja sensibilidad para identificar muestras de control positivas para IFI indica que las estrategias de IFI siguen siendo el procedimiento preferido (Nifli AP, y col, *Journal of Immunological methods* 311 (2006), 189-197).

Se han propuesto diversos sustratos para los ensayos de AAN por IFI, sin embargo, el procedimiento más establecido es el cribado de AAC no específicos de órganos en células HEP-2. En general, después de la evaluación de AAN se realiza la detección de AAC específico para, por ejemplo, antígenos nucleares extraíbles (ANE) y antígenos citoplasmáticos por inmunoensayos que emplean antígenos naturales purificados o recombinantes. Esta estrategia en dos fases presenta los siguientes beneficios: (i) cribado altamente sensible de los AAC más frecuentes, no específicos de órganos, clínicamente relevantes, (ii) combinación óptima con otras técnicas de ensayo por la diferenciación aguas abajo de reactividades de los AAC basándose en el patrón de IFI detectado y en el diagnóstico sospechado (por ejemplo, SS-A/Ro y SS-B/La), (iii) evaluación de AAC clínicamente relevantes sin la necesidad de más ensayos (por ejemplo, AAC anti-centrómero) y (iv) evaluación de AAC solo detectables por IFI en el caso de dianas autoantigénicas desconocidas o ensayos no disponibles en el mercado.

Otro ejemplo es la detección de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN) para el diagnóstico diferencial de vasculitis sistémica (Bosch X, y col., *Lancet* 2006; 368: 404-18). Debido a la aparición de ACAN en estos trastornos autoinmunitarios sistémicos, la expresión vasculitis asociada a ACAN (VSAA) se ha acuñado para estas entidades clínicas. Los ACAN se descubrieron por IFI, que aún es el procedimiento recomendado para detectar estas reactividades de anticuerpos. Normalmente, los ACAN muestran dos patrones de tinción diferentes de granulocitos fijados en IFI; un patrón citoplasmático moteado (cACAN) y un patrón perinuclear (pACAN). Los cACAN que se encuentran frecuentemente en pacientes con granulomatosis de Wegener (GW), están dirigidos principalmente contra la proteinasa 3 (PR3), además de otras dianas, mientras que los pACAN, producidos principalmente en la poliangitis microscópica (PAM), están dirigidos principalmente contra la mieloperoxidasa (MPO) (Van der Woude FJ, y col., *Lancet* 1985; 1: 425-9; Csernok E, y col., *Nat Clin Pract Rheumatol.* Abril de 2006; 2(4): 174-5), además de otras dianas.

Se ha propuesto que las estimaciones de las concentraciones de anticuerpos, son útiles en el diagnóstico y el tratamiento de estas entidades clínicas. Los valores de anticuerpo normalmente se asocian con la gravedad de la enfermedad (Cohen Tervaert JW, y col., *Arch Intern Med* 1989; 149: 2461-5). Sin embargo, ha habido otros antígenos diana para ACAN descritos en IFI que pueden encontrarse en pacientes sin VSAA (Savige J, y col., *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 19: 263-76, Savige J, y col., *Am J Clin Path* 2003; 120:312-8). En consecuencia, de acuerdo con las directrices consenso establecidas recientemente, además de la IFI, para la detección de ACAN se recomienda una técnica diferente, tal como ELISA.

Sin embargo, las técnicas empleadas para determinar varios anticuerpos mediante la estrategia bi- o multifase mencionada anteriormente implican una pluralidad de ensayos de constituyentes marcados individualmente. Con respecto a la rentabilidad de los diagnósticos serológicos existe una clara demanda de combinar, por un lado, la detección de anticuerpos para dianas antigénicas celulares y tisulares y, por otro lado, para sus proteínas caracterizadas y purificadas, en un solo procedimiento con una etiqueta.

La caracterización actual de proteínas mediante tecnología de micromatrices no proporciona por sí sola ninguna solución satisfactoria. Al aumentar el número de dianas antigénicas a ensayar en una sola micromatriz, la demanda de equipos de fabricación asociados, la miniaturización y los materiales y el manejo especializados, harán que la producción de dichas micromatrices sea cada vez más compleja y costosa. Otras técnicas, incluyendo el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), los ensayos cromógenos, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS), y la cromatografía de capa fina (TLC), presentan la desventaja de estar limitadas en cuanto al número de analitos en forma antigénica que puedan evaluarse simultáneamente. Además requieren mucho tiempo y equipos costosos. Por el contrario, empleando un sustrato de células HEP-2 para la detección de AAN se proporcionan más de 1.200 dianas antigénicas para la identificación de anticuerpos.

Resumen de la invención

En vista del problema técnico subyacente de la técnica anterior, la presente invención proporcionará un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades, que reduce un diagnóstico multi-etapa a un procedimiento de una etapa. Este problema se resuelve por las características de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la presente invención las proporcionan las reivindicaciones dependientes.

El objetivo de la invención es, por lo tanto, proporcionar un procedimiento y un sistema para el diagnóstico de enfermedades que detecta anticuerpos unidos a sustratos celulares y/o tisulares y detecta simultáneamente anticuerpos unidos a sustratos sintéticos, tales como micropartículas revestidas con antígenos específicos naturales purificados y/o recombinantes, proporcionando de este modo un procedimiento de "una etapa" para la detección simultánea de anticuerpos asociados con enfermedades tanto a baja especificidad (específica celular y/o tisular) como a alta especificidad (específica antigénica).

La invención se refiere, además, a un dispositivo y a un kit para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. El procedimiento también es adecuado para un procedimiento de cribado, en el que la reactividad de múltiples sueros de pacientes puede ensayarse contra cualquier número de antígenos específicos determinado.

Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades que comprende la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o más sustratos sintéticos, caracterizado por:

a) proporcionar una mezcla de sustratos celulares y sintéticos, donde el sustrato sintético es una micropartícula o perla revestida con antígeno al que es capaz de unirse un anticuerpo a detectar, y donde el sustrato celular es una célula de mamífero, múltiples células de mamífero y/o tejido orgánico,

b) incubación de dicha mezcla de sustratos con una muestra que contiene el anticuerpo a detectar,

c) detección y/o identificación de sustratos celulares y sintéticos y anticuerpos unidos a dichos sustratos usando microscopía de fluorescencia, y

d) evaluación de datos de imágenes de inmunofluorescencia, preferentemente usando un sistema de interpretación de reconocimiento de patrones automatizado.

El sustrato celular representa un sustrato biológico para unión del antígeno, tal como una célula de mamífero, con lo que pueden aplicarse combinaciones de diferentes tipos de tejido o células. Los sustratos tisulares, constituidos por múltiples células de un tipo similar obtenidas de tejido orgánico, también pueden usarse como el "sustrato celular" en el procedimiento de la presente invención.

En una realización preferida del procedimiento mencionado anteriormente, el sustrato celular o tisular puede ser células HEp-2, granulocitos humanos y/o tejido orgánico, preferentemente tejido pancreático.

En una realización preferida, el sustrato sintético es una micropartícula o perla revestida con antígeno nativo purificado y/o antígeno recombinante. Los antígenos pueden ser proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, tales como ADN, estructuras celulares multimoleculares tales como centrómeros, complejos de proteínas o estructuras de proteína-membrana, o esencialmente cualquier otro componente celular al que pueden unirse anticuerpos. Se pretende que el sustrato sintético actúe como un vehículo para un antígeno específico, o una mezcla de antígenos específicos, purificados y/o recombinantes. En la técnica se conocen vehículos de micropartículas y perlas de diversas sustancias y materiales, y son adecuados para el procedimiento de la presente invención, por ejemplo, micropartículas, partículas o perlas compuestas por polímeros naturales o artificiales, sefarosa, celulosa, vidrio u óxidos metálicos.

En una realización preferida de la invención, el procedimiento de diagnóstico de enfermedades se caracteriza porque al revestimiento antigénico del sustrato sintético se unen anticuerpos asociados con la presencia de la enfermedad. El antígeno que reviste el sustrato sintético se selecciona de acuerdo con su asociación con una enfermedad conocida. La identificación de anticuerpos que se unen a antígenos específicos permite, por lo tanto, un diagnóstico de enfermedad con "alta especificidad", además de una detección de "baja especificidad" de anticuerpos unidos a sustratos celulares y/o tisulares.

Se pretende que los sustratos de la presente invención sean detectados y/o identificados mediante una o más características o parámetros distintivos. En una realización, el procedimiento de la presente invención se caracteriza por que las características ópticas, fluorescentes y/o físicas de los sustratos se usan para detectar y/o identificar dichos sustratos. Por ejemplo, los diversos sustratos pueden identificarse por su tamaño, forma, propiedades fluorescentes u otros parámetros durante el análisis microscópico. Los diversos parámetros también pueden combinarse para los diversos sustratos, representando de este modo un tipo de código para la identificación de sustratos, antígenos y/o anticuerpos.

En una realización de la invención, el procedimiento se caracteriza porque la característica fluorescente de concentración de fluoróforo, por ejemplo concentración de rodamina, y/o la característica física de tamaño se usa para identificar el sustrato sintético, con lo que el tamaño de la perla o micropartícula está preferentemente entre 1-100 μm , por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100 μm , o cualquier valor similar. Pueden combinarse múltiples perlas o micropartículas de diferentes tamaños, con lo que cada tamaño de perla esté revestido con un antígeno diferente, de modo que una estrategia similar a una matriz para múltiples antígenos pueda aplicarse simultáneamente con sustratos celulares.

En una realización preferida de la presente invención, se usa microscopía fluorescente multicolor para identificar dichos sustratos y/o autoanticuerpos unidos, con lo que los sustratos y/o anticuerpos unidos muestran diferentes colores fluorescentes, preferentemente azul, verde y rojo.

En una realización de la presente invención, el sustrato celular está marcado con un colorante fluorescente con emisión en el azul, por ejemplo DAPI, el sustrato sintético está marcado con un colorante fluorescente con emisión en el verde, por ejemplo rodamina o FITC, y/o el anticuerpo unido de forma específica es detectado por un anticuerpo específico anti-inmunoglobulina humana marcado con un colorante fluorescente con emisión en el rojo, por ejemplo Cy5 y/o alofocianina (APC).

El procedimiento de la presente invención se refiere especialmente a enfermedades o trastornos donde la detección de anticuerpos proporciona un diagnóstico eficaz. En una realización preferida, el procedimiento se caracteriza porque la enfermedad es un trastorno autoinmunitario o infeccioso, preferentemente una afección reumática sistémica, trastorno hepático autoinmunitario, diabetes de tipo 1, enfermedad de Lyme o virus del herpes simple.

Aunque las enfermedades autoinmunitarias son difíciles de diagnosticar, la identificación de uno o más antígenos específico a los que se unen autoanticuerpos, además del patrón de unión de autoanticuerpos sobre el sustrato celular, permite un diagnóstico más preciso en un periodo más corto que lo que se conocía anteriormente. La presente invención permite un procedimiento de diagnóstico que combina estrategias basadas en matrices y celulares que, hasta ahora, nunca fue considerado posible.

En una realización de la invención, los anticuerpos a detectar son anticuerpos antinucleares (AAN) o anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN).

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque se usan células HEp-2 para analizar la tinción de anticuerpos antinucleares (AAN).

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque los patrones de tinción celular de AAN, los antígenos correspondientes y las enfermedades asociadas, tal como se presentan en la tabla 3, la tabla 4 y/o la tabla 5, se usan en el diagnóstico de enfermedades.

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque se usan granulocitos humanos para analizar la tinción de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN).

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque los patrones de tinción celular de ACAN, los antígenos correspondientes y las enfermedades asociadas, tal como se presentan en la tabla 1 y/o la tabla 2, se usan en el diagnóstico de enfermedades.

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque los anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN) muestran una tinción perinuclear (p-ACAN) o tinción citoplasmática moteada (cACAN) de granulocitos humanos.

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque los anticuerpos están

dirigidos contra las proteínas proteinasa 3 (PR3) o mieloperoxidasa (MPO), o sus antígenos.

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque los anticuerpos muestran tinción citoplasmática moteada (cACAN) de granulocitos humanos y se unen a proteinasa 3 (PR3), con lo que la proteína o sus antígenos están provistos sobre un sustrato sintético, proporcionando por lo tanto un diagnóstico de granulomatosis de Wegener (GW).

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque los anticuerpos muestran tinción perinuclear (p-ACAN) de granulocitos humanos y se unen a mieloperoxidasa (MPO), con lo que la proteína o sus antígenos están provistos sobre un sustrato sintético, proporcionando por lo tanto un diagnóstico de vasculitis asociada a ACAN (VSAA).

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento se caracteriza porque la muestra comprende sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, o saliva obtenida de un sujeto, con lo que el sujeto debe entenderse como un paciente del que se sospecha que tiene una enfermedad o dolencia que se diagnosticará usando el procedimiento de la presente invención.

La invención también abarca un procedimiento mediante el cual el sistema de interpretación está controlado por software diseñado especialmente, tal como software que ha sido desarrollado específicamente para aplicación en el procedimiento de la presente invención, que consiste en módulos para el control de dispositivos y de autoenfoco, adquisición de imágenes, análisis de imágenes, y/o algoritmos de reconocimiento de patrones.

En una realización, el procedimiento de la invención se caracteriza porque el sistema de interpretación se usa para evaluar los datos de imágenes de inmunofluorescencia de acuerdo con la siguiente jerarquía:

i) señal de tinción positiva,

ii) localización de la tinción, preferentemente mediante clasificación de patrones de tinción en sustrato celular o sustrato sintético, y

iii) determinación de patrones celulares, preferentemente patrones perinucleares y/o citoplásmicos para granulocitos; patrones nucleares citoplásmicos y/o cromatínicos de células mitóticas para células HEp-2.

Esta jerarquía facilita un análisis rápido y preciso de las imágenes microscópicas adquiridas y, por lo tanto, permite un diagnóstico basándose en parámetros múltiples en los datos de inmunofluorescencia.

En una realización, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la clasificación de patrones de tinción en celulares o sintéticos y la determinación de patrones celulares se consigue a través de una combinación de características de estructura y textura de la imagen de inmunofluorescencia definiendo un conjunto de reglas para cada patrón. Esta clasificación puede llevarse a cabo mediante software diseñado especialmente, tal como software que ha sido desarrollado específicamente para aplicación en el procedimiento de la presente invención.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un sistema para la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o más sustratos sintéticos de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende

a) un microscopio fluorescente con una cámara, una platina de exploración motorizada y diodos emisores de luz multicanal (LED), y

b) un dispositivo informático con software que consiste en módulos para control de dispositivos y autoenfoco, adquisición de imágenes automatizada, análisis de imágenes automatizado, y algoritmos de reconocimiento de patrones automatizados con lo que se analizan canales de tres colores, preferentemente azul, verde y rojo, y

c) una mezcla de sustratos celulares y sintéticos con una muestra que contiene el anticuerpo a detectar y permite la detección y/o identificación de sustratos celulares y sintéticos y anticuerpos unidos a dichos sustratos, donde el sustrato sintético es una micropartícula o perla revestida con antígeno al que es capaz de unirse un anticuerpo a detectar, y donde el sustrato celular es una célula de mamífero, múltiples células de mamífero y/o tejido orgánico.

El sistema de la presente invención se ha desarrollado específicamente para aplicación en el procedimiento de diagnóstico de enfermedades de la presente invención. Dicho sistema puede comprender un microscopio fluorescente acoplado a un ordenador de procesamiento de datos, tal como un PC.

- 5 Un aspecto de la invención es también un kit para la detección simultánea y/o la identificación de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o más sustratos sintéticos de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 1-21, que comprende a) portaobjetos con sustrato celular fijado mezclado con el sustrato sintético revestido de anticuerpo, con lo que el sustrato celular es preferentemente células HEP-2 y/o granulocitos humanos, y los sustratos sintéticos se distinguen entre sí de acuerdo con sus características ópticas, fluorescentes y/o físicas, donde el sustrato sintético es una micropartícula o perla revestida con antígeno al que es capaz de unirse un anticuerpo a detectar, y donde el sustrato celular es una célula de mamífero, múltiples células de mamífero y/o tejido orgánico, y b) conjugado con un anticuerpo específico de inmunoglobulina, conjugado con una etiqueta fluorescente, preferentemente FITC, Cy5 y/o APC, y opcionalmente tampón de lavado, cubreobjetos, medio de cobertura, sustrato sintético no revestido, con o sin etiqueta fluorescente, y/o etiquetas fluorescentes adicionales para sustratos sintéticos.

Los kits de la presente invención permiten un procedimiento de diagnóstico extremadamente simplificado y económico en comparación con los estándares conocidos en la técnica. Un portaobjetos del kit puede contener múltiples sustratos sintéticos con múltiples epítomos, que esencialmente combinan una estrategia basada en matrices con la estrategia de sustrato celular, proporcionando de este modo una herramienta de diagnóstico más completa y eficiente que cualquier cosa conocida en la técnica, que está presente en una forma compacta que es económicamente viable.

Descripción detallada de la invención

25 El procedimiento de la presente invención permite el diagnóstico de enfermedades para las que normalmente se requieren diagnósticos multi-etapa. Las etapas de diagnóstico múltiples para la evaluación de anticuerpos que se unen a especificidades crecientes se combinan en este procedimiento para proporcionar un diagnóstico más rápido, eficiente y exacto en un solo análisis de diagnóstico.

30 Este procedimiento se refiere especialmente a enfermedades o trastornos donde la detección de anticuerpos proporciona un diagnóstico eficaz, tales como enfermedades infecciosas y trastornos autoinmunitarios. El procedimiento permite el cribado de no solamente la presencia y patrón de unión de anticuerpos en células o tejidos, sino que también puede proporcionar información más específica sobre los antígenos individuales a los que se dirigen los anticuerpos. Esto facilita el diagnóstico de trastornos específicos en un procedimiento de una etapa.

El término diagnóstico se refiere a la identificación y/o determinación de la naturaleza o causa de una enfermedad a través de la evaluación de características del paciente. La presente invención proporciona un procedimiento de diagnóstico que, cuando se lleva a cabo, proporciona una indicación de una enfermedad o enfermedades particulares que pueden estar presentes en el paciente. Por ejemplo, múltiples enfermedades autoinmunitarias pueden estar presentes en un sujeto cualquiera, de modo que el procedimiento de la presente invención no excluye la existencia de otras enfermedades mediante la identificación de una enfermedad, por ejemplo múltiples enfermedades también podrían detectarse o diagnosticarse simultáneamente o por separado, usando el procedimiento de la presente invención.

45 El procedimiento de la presente invención está particularmente adaptado para el diagnóstico de trastornos inflamatorios reumáticos sistémicos, tales como vasculitis sistémica autoinmunitaria. Dichos trastornos asociados con anticuerpos dirigidos a antígenos dentro de granulocitos (ACAN), tales como poliangeitis microscópica (PAM), asociada con anticuerpos contra la mieloperoxidasa (MPO), y granulomatosis de Wegener (GW), asociada con anticuerpos contra proteinasa 3 (PR3), pueden diagnosticarse usando el procedimiento de la presente invención. El lupus eritematoso sistémico puede diagnosticarse, por ejemplo, cuando se asocia con anticuerpos dirigidos a ADN bicatenario. La polimiositis también puede diagnosticarse usando la presente invención, por ejemplo, cuando se asocia con anticuerpos dirigidos a antígenos dentro de células HEP-2 tales como tARN sintetasas.

50 Con la presente invención también pueden diagnosticarse trastornos hepáticos autoinmunitarios, tales como hepatitis autoinmunitaria, por ejemplo, cuando se asocian con anticuerpos dirigidos a antígenos dentro de células HEP-2. También pueden diagnosticarse trastornos asociados con anticuerpos contra actina fibrilar, el receptor de asialoglucoproteína u otros antígenos dentro de hepatocitos.

En la tabla 1 se presenta una lista de tipos de anticuerpo citoplasmático antineutrófilos relevantes y patrones

celulares asociados en granulocitos. La tabla 1 proporciona ejemplos de anticuerpos, patrones de tinción y su relevancia clínica asociada. Esta tabla no pretende limitar el alcance de la invención.

Tabla 1.

5

Tipos de anticuerpos y patrones celulares relevantes				
Anticuerpo	Antígeno, epítipo	Distribución histológica	Detección por TIF y otros procedimientos	Presencia y relevancia de diagnóstico
ACAN	Enzimas en gránulos citoplasmáticos, granulocitos neutrófilos, por ejemplo, proteinasa 3, mieloperoxidasa, elastasa, catepsina G, azurocidina, lactoferrina, lisozima, BPI	Citoplasma: gránulos específicos (granulocitos neutrófilos)	Granular, perinuclear o atípica (citoplasmática): cACAN, pACAN, aACAN o xACAN; TIF indirecta sobre granulocitos neutrófilos (fijados con etanol o formalina)	cACAN (proteinasa 3) y pACAN (mieloperoxidasa) son marcadores para vasculitis sistémica. Además, patrones de pACAN típicos o atípicos se descubren en artritis reumatoide, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, colangitis esclerosante primaria y fibrosis quística.
cACAN	Enzimas en gránulos citoplasmáticos granulocitos neutrófilos: proteinasa-3 (PR-3) y BPI	Citoplasma: gránulos específicos (granulocitos neutrófilos)	Granular (citoplasma), cACAN: a menudo debido a anticuerpos dirigidos contra PR-3, también debido a anticuerpos dirigidos contra BPI, TIF indirecta sobre granulocitos neutrófilos (fijados con etanol o formalina)	cACAN (proteinasa 3) casi exclusivamente en granulomatosis de Wegener, cribado también en casos potenciales de vasculitis sistémica
pACAN	Enzimas en gránulos citoplasmáticos granulocitos neutrófilos: mieloperoxidasa (MPO), elastasa, catepsina G, azurocidina, lactoferrina, lisozima y otros antígenos diana aún no identificados	Citoplasma: gránulos específicos (granulocitos neutrófilos)	Perinuclear (citoplasma), pACAN: generalmente debido a anticuerpos dirigidos contra MPO. El patrón es causado por desplazamiento durante la fijación con etanol. Con fijación con formalina, el patrón es citoplasmático granular; TIF indirecta sobre granulocitos neutrófilos (fijados con etanol)	pACAN se indica en vasculitis (vasculitis asociada a ACAN, por ejemplo, poliangeitis microscópica y glomerulonefritis pauciinmunitaria), enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, hepatitis autoinmunitaria

En la tabla 2 se presenta una lista de antígenos relevantes que pueden aplicarse al sustrato sintético de la presente invención. Este listado no pretende limitar el alcance de la invención. A partir de la tabla 1 es evidente que, para cada uno de los patrones celulares, pueden indicarse múltiples enfermedades. Con el fin de proporcionar un diagnóstico más concreto, se requiere información más detallada sobre el antígeno particular al que se unen los anticuerpos. Se vuelve evidente a partir de la tabla 2 que cada uno de los antígenos particulares muestra una asociación estrecha con una enfermedad, de modo que una señal positiva para dicho antígeno en el procedimiento de la presente invención, en combinación con el patrón celular, permite un diagnóstico mejorado en comparación con aquellas técnicas conocidas en la técnica.

15

La presente invención representa, por lo tanto, una novedosa combinación de técnicas analíticas para proporcionar un diagnóstico mejorado. La invención se refiere a una invención de combinación, con lo que la novedad de los componentes individuales no es importante, sino que, en su lugar, la combinación particular tal como se reivindica causa resultados sorprendentes y un efecto sinérgico. La presente invención muestra un efecto sinérgico entre los componentes, con lo que el análisis simultáneo de anticuerpos del paciente a especificidad tanto baja (celular y/o tisular) como alta (antigénica) proporciona un procedimiento mucho más rápido y un diagnóstico más concreto en

20

comparación con aquellos procedimientos conocidos en la técnica anterior.

Tabla 2.

Antígenos individuales que son relevantes para aplicación sobre el sustrato sintético o perlas de la presente invención				
Anticuerpo	Antígeno, epítipo	Distribución histológica	Detección por TIF y otros procedimientos	Presencia y relevancia de diagnóstico
Mieloperoxidasa	Homodímero de mieloperoxidasa de aprox. 140 kD, cataliza la peroxidación de cloruro a hipoclorito; destrucción intracelular de microorganismos fagocitados, inactivación de inhibidores de proteasa	Citoplasma: gránulos azurófilos (granulocitos neutrófilos)	ELISA con mieloperoxidasa purificada	MPO-ACAN es un marcador de diagnóstico para poliangitis microscópica (PAM) y para glomerulonefritis necrótica focal pauciinmunitaria (puede desarrollarse a glomerulonefritis rápidamente progresiva, GMRP. Nota: la glomerulonefritis pauciinmunitaria como parte de vasculitis sistémica o como forma idiopática (sin vasculitis extra-renal)
Proteinasa 3	Proteinasa-3, serina proteinasa neutra	Citoplasma: gránulos azurófilos (granulocitos neutrófilos)	ELISA con proteinasa-3 purificada o recombinante (expresada en células eucariotas)	PR3-ACAN es un marcador de diagnóstico para granulomatosis de Wegener. Formas temprana y abortiva, además una serie de formas de Wegener limitadas, puede diagnosticarse debido a la elevada especificidad. La señal de PR3-ACAN se correlaciona con la actividad de la enfermedad
Elastasa	Elastasa	Citoplasma: gránulos azurófilos (granulocitos neutrófilos)	ELISA con elastasa purificada	véase pACAN
Catepsina G	Catepsina G	Citoplasma: gránulos azurófilos (granulocitos neutrófilos)	ELISA con catepsina G purificada	véase pACAN
Lactoferrina	Lactoferrina	Citoplasma: gránulos azurófilos (granulocitos neutrófilos)	ELISA con lactoferrina purificada	véase pACAN
Lisozima	Lisozima	Citoplasma: gránulos azurófilos (granulocitos neutrófilos)	ELISA con lisozima purificada	véase pACAN

Azurocidina	Azurocidina, proteína antimicrobiana catiónica (CAP37)	Citoplasma: gránulos azurófilos (granulocitos neutrófilos)	ELISA con azurocidina purificada	Azurocidina-ACAN de forma predominante en vasculitis sistémica; los anticuerpos para azurocidina a menudo pueden ser detectados junto con otras especificidades de ACAN
-------------	--	--	----------------------------------	---

- En la tabla 3 se presenta una lista de anticuerpos antinucleares relevantes y relevancia clínica asociada. Este listado no limita el alcance de la invención. Se representa la incidencia de anticuerpos antinucleares en enfermedades autoinmunitarias sistémicas. La incidencia de anticuerpos antinucleares y su asociación con enfermedades específicas es conocida en la técnica (Arbuckle MR y col. *New Engl J Med* 2003; 349: 1226-33, Bradwell AR y Hughes RG. *Atlas of HEp-2 patterns*. 3ª ed. 2007, Dalakas MC y col. *Lancet* 2003, 362: 971-82, Fox RI. *Lancet* 2005; 366: 321-31, Rahman A y col. *New Engl J Med* 2008; 358: 929-39, Tan EM y col. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1601-11, Ziswiler H-R y col. *Swiss Med Wkly* 2007; 137: 586-90).
- 10 Abreviaturas: LES: lupus eritematoso sistémico; EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo (síndrome de Sharp); DM/PM dermatopolimiositis; AR: artritis reumatoide; ESc: esclerosis/esclerodermia sistémica; ESSL: esclerodermia sistémica limitada (síndrome de CREST); LE med.: lupus eritematoso inducido por medicamentos; CAI: colangitis autoinmunitaria; CBP: cirrosis biliar primaria.
- 15 Las enfermedades proporcionadas en las tablas 1 a 4 pretender ser ejemplos de dolencias, afecciones y/o enfermedades a diagnosticar mediante el procedimiento de la presente invención.

Tabla 3.

Incidencia (%) de anticuerpos antinucleares (IgG) en enfermedades autoinmunitarias sistémicas								
Antígeno Hep-2	LES	LE med.	EMTC	AR	Sjögren	ESc	ESSL	DM/PM
AAN IIF HEp2 1:≥:160 ^a	95	95	100	14	74	87	55-80	60
ds-ADN	70-80	3	<5	<5	<5	<5	<5	<5
nucleosomas	60-90	95	<5	11	8	<5	-	<5
centrosomas	-	-	-	-	-	10	55-80	-
Sm	10-30	-	-	-	-	-	-	-
U1-snRNP (Sm-RNP) ^b	60	-	100	<5	3	6	<5	6
snRNP p68 / A	20-50	-	100	<5	3	6	<5	6
SS-A/Ro p52	30 ^c	-	<5	<5	65	<5	<5	25 ^d
SS-A/Ro p60	30-40	-	<5	10	75	9	<5	15
SS-B/La	15-20 ^c	-	<5	15	50	<5	<5	5
rRNP ^e	20	-	-	-	-	-	-	-
Scl-70	-	-	-	-	5	30 - 50	13	10
fibrilarina (U3-snoRNP)	-	-	-	-	-	8	3	-
ARN-polimerasas	<5	-	<5	<5	-	4-20	-	-
Jo-1	-	-	-	-	-	3	-	16
PL-7, PL-12	-	-	-	-	-	-	-	4
SRP	-	-	-	-	-	-	-	<3
Mi-2	-	-	-	-	-	-	-	10-15
PM-Scl	-	-	-	-	-	3 25-50 ^f	-	8 25-50 ^f
PCNA	3	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda para la tabla 3:
^a especificidad 95 %
^b complejo U1-snRNP-: IgG contra Sm y/o U1-snRNP p68/A y/o epítomos terciarios
^c Importancia patógena en lupus neonatal con av-Block en hasta el 5% de los casos. SS-A/Ro52 IgG reconocen un receptor serotoninérgico 5-HT4 cardiaco y los inhiben mediante corrientes de calcio de tipo L activadas por serotonina (ICa).
^d SS-A/Ro p52 IgG junto con Jo-1 IgG en miopatías inflamatorias
^e rRNP: RNP ribosómico con las proteínas P0, P1 y P2
^f In DM/PM con ESc

20

La tabla 4 presenta patrones nucleares (IFI) para anticuerpos antinucleares cuando están unidos a células HEp-2.

Puede verse a partir de la tabla 4 que patrones celulares/nucleares similares o iguales son visibles para diferentes enfermedades. La tabla 5 presenta patrones celulares adicionales (citoplasmáticos) para anticuerpos unidos a células HEP-2. Aunque un análisis celular puede proporcionar indicios o soporte para la presencia o ausencia de una enfermedad autoinmunitaria, la inmunofluorescencia indirecta usando solamente sustratos celulares no puede proporcionar un diagnóstico concreto óptimo. También se proporcionan en las tablas 4 y 5 listas de antígenos particulares, que podrían aplicarse al sustrato sintético de la presente invención. La combinación de patrón celular (interfase nuclear, mitosis y citoplasma) y antígeno específico (antígeno) causa a continuación un diagnóstico mejorado y más seguro de la enfermedad o afección.

10

Tabla 4.

Detección de anticuerpos antinucleares (AAN) en células HEP-2 (AAN IIF HEP2)			
Interfase nuclear	Mitosis (Cromatina)	Antígeno	Asociación a enfermedades
moteada fina,	negativa	SS-A (Ro52 o Ro60), SS-B (La)	Sjögren, LES, EMTC
moteada fina,	negativa	ARN-Polimerasa II,	ESc
moteada fina,	negativa	Ku, <i>inter alia</i>	LES, Sjögren, ESc, DM/PM
moteada fina,	negativa	Mi-2 (Helicasa)	DM-ESc
moteada	negativa	Sm	LES
moteada	negativa	U1-snRNP	EMTC, LES, ESc
moteada	negativa	otro snRNP	PM-ESc, LES, EMTC, Raynaud, Sjögren
moteada gruesa	negativa	hnRNP (matriz nuclear)	LES, EMTC, AR, ESc
moteada, 46 puntos / nuclear	positive	Centrómero (principalmente CENP-B)	ESSL
moteada, 5 - 15 puntos / nuclear	negativa	Puntos en el núcleo (sp100)	CAI / CBP
moteada, 2 - 6 puntos / nuclear	negativa	Cuerpos espiralados en el núcleo (coilina p80)	CAI / CBP
moteada, células individuales (fase S)	negativa	PCNA (Ciclina)	LES
homogénea / nucléolos forma circular	débil	Scl-70 (Topoisomerasa)	ESc
homogénea / periférica	positiva	ds-ADN	LES
homogénea / periférica	positiva	Histona	LE med.
membrana granular	negativa	Nucleoporinas, gp210	CAI / CBP
nucléolo moteada	punteada	ARN-Polimerasa I, regiones organizadoras	ESc, LES, EMTC, AR

		nucleolares (RON)	
nucléolo grumoso	positiva	Fibrilarina (U3-snoRNP)	ESc
nucléolo homogéneo	negativa	PM-Scl	DM/PM + ESc
nucléolo homogéneo, nucleoplasma débil homogénea-moteada	negativa	Th/To	ESSL, Raynaud, LES, PM, AR

Tabla 5.

Citoplasma	Antígeno	Asociación a enfermedades
moteada, difusa	mitocondrias (piruvato deshidrogenasa)	CBP
granular, fina, difusa	Proteínas P ribosómicas (rRNP)	LES
granular	Jo-1 (histidil-tARN-sintetasa)	PM
granular	PL-7 (treonil-tARN-sintetasa)	PM
granular	PL-12 (alanil-tARN-sintetasa)	PM
granular	SRP (proteínas de 54 kDa (entre otras))	Síndrome de miopatía anti-SRP-, en su mayoría relacionada con una PM
fibrilar, difusa	actina polimerizada	AIHep tipo 1
fibrilar, difusa	tubulina, vimentina	Infecciones

5 La diabetes de tipo 1 también puede diagnosticarse usando la presente invención, por ejemplo, cuando se asocia con anticuerpos dirigidos contra células de los islotes pancreáticos, glutamato descarboxilasa o tirosina fosfatasa IA-2.

10 Una clase más de trastornos que puede diagnosticarse con el procedimiento de la presente invención se refiere a enfermedades infecciosas. Dichas enfermedades incluyen borreliosis o enfermedad de Lyme, donde la enfermedad se asocia con anticuerpos dirigidos contra *Borrelia* o proteínas de *Borrelia* tales como la p21, p41, p100, OSPC u OSPA.

15 El virus del herpes simple es otra enfermedad infecciosa que puede diagnosticarse usando la presente invención, por ejemplo cuando se asocia con anticuerpos dirigidos contra el virus del herpes simple de tipo 1 (herpes labial) y tipo 2 (herpes genital). Pueden usarse células infectadas por herpes como sustrato celular, junto con sustrato sintético que contiene antígenos de herpes específicos, tales como gG1 y gC1 para el tipo 1 y gG2 para el tipo 2.

20 El uso de soportes pequeños revestidos de antígeno, tales como las micropartículas codificadas por características ópticas o físicas de las mismas, o por adhesión con moléculas de información, junto con sustratos celulares y/o tisulares en un entorno de ensayo, proporciona sorprendentemente una base adecuada para la evaluación simultánea de múltiples actividades de anticuerpo perfiladas anteriormente en la estrategia multi-fase.

25 El procedimiento reportero óptimo para dicha técnica de detección es la fluorescencia multicolor, que puede emplearse fácilmente para codificar partículas y como una etiqueta para evaluar de manera simultánea múltiples interacciones antígeno-anticuerpo específicas. Un microscopio totalmente automatizado con un software de reconocimiento de patrones, lee las señales de fluorescencia que codifican partículas revestidas con diversos antígenos específicos, además de las señales de fluorescencia producidas por la detección de anticuerpos unidos a dianas sobre sustratos de partículas, celulares y/o tisulares.

30

El software de reconocimiento de patrones permite la determinación simultánea de sustratos celulares y/o tisulares y sintéticos. Un conjunto de reglas definido para cada patrón (para patrones de sustratos tanto celulares/tisulares como sintéticos) permite al software identificar a qué sustrato específico corresponde cada señal fluorescente. Esto sucede gracias a las características ópticas, fluorescentes y/o físicas exclusivas de los diferentes sustratos. Estas características actúan como un código para que el software reconozca a qué sustrato se han unido los anticuerpos (y por lo tanto a qué antígeno específico). La determinación automática de patrones específicos celulares (tales como perinuclear y citoplasmático para granulocitos; nuclear, citoplasmático, citoplasmático moteado, cromatínico de células mitóticas para células HEP-2) proporciona información adicional que conduce al diagnóstico de la enfermedad, tal como se ha explicado anteriormente para PAM y GW.

10

El uso del reconocimiento sofisticado de patrones anula la necesidad de que el personal tenga que estar altamente formado y de que tenga que entender las varias diferentes configuraciones de sistemas y los patrones de fluorescencia que son específicos de anticuerpos particulares. Dichos requisitos normalmente requieren costes elevados en la formación del personal. En términos de estándares de calidad y especificaciones de validación, a menudo es necesario realizar repeticiones experimentales, lo que requiere la supervisión de científicos o de cualquier otro personal altamente cualificado. Se necesita una reproducibilidad coherente y una alta calidad particularmente en la IFI basada en células. La interpretación de patrones por inmunofluorescencia se ve influenciada por el conocimiento y la cualificación individual del investigador. Por lo tanto, es común que exista una alta variabilidad intra- e interlaboratorios y representa un problema de diagnóstico importante, especialmente en laboratorios no especializados.

15

20

La lectura automatizada de patrones de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos contra dianas celulares y antigénicas purificadas por sistemas automatizados de interpretación y reconocimiento inteligente de patrones, proporciona una base fiable para diagnósticos serológicos rentables, particularmente para los laboratorios con un gran número de muestras. La oportunidad de aplicar análisis y gestión de datos electrónicos modernos puede aliviar significativamente la pesada carga de trabajo en dichos laboratorios.

25

Descripción de las figuras

30

La invención se describe adicionalmente mediante las figuras. Estas no pretenden limitar el alcance de la invención.

Figura 1: análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos para MPO

Figura 2: análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos para PR3

35

Fig. 1: en la figura 1 se muestran los resultados del análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos para MPO. Una muestra de suero, que ya se había ensayado como positiva para pACAN (MPO), y otra muestra de suero, que ya se había ensayado como positiva para cACAN (PR3), se ensayaron en portaobjetos con granulocitos humanos junto con micropartículas revestidas con MPO. La ubicación de los granulocitos en el portaobjetos se detectó mediante tinción con DAPI mientras que las micropartículas revestidas con antígeno se evaluaron mediante fluorescencia con rodamina o FITC. El suero positivo para pACAN demostró una señal positiva tanto con los granulocitos inmovilizados como con las micropartículas revestidas con MPO. La unión de los anticuerpos a la MPO ubicada en los granulocitos e inmovilizada sobre las partículas (mostradas con flechas) se mostró mediante tinción específica con el conjugado Cy5. Por el contrario, el suero positivo para cACAN generó una reacción positiva solamente con los granulocitos.

40

45

Fig. 2: en la figura 2 se muestran los resultados del análisis inmunofluorescente simultáneo de ACAN y anticuerpos para PR3. Una muestra de suero, que ya se había ensayado como positiva para pACAN (MPO), y una muestra de suero que ya se había ensayado como positiva para cACAN (PR3), se ensayaron en portaobjetos con granulocitos humanos junto con micropartículas revestidas con PR3. La ubicación de los granulocitos se detectó mediante tinción con DAPI mientras que las micropartículas revestidas con antígeno se evaluaron mediante fluorescencia con rodamina o FITC. El suero positivo para cACAN demostró una señal positiva tanto con los granulocitos inmovilizados como con las micropartículas revestidas con PR3. La unión de los anticuerpos a PR3 ubicada en los granulocitos e inmovilizada sobre las partículas (mostradas con flechas) se mostró mediante tinción específica con el conjugado Cy5. Por el contrario, el suero positivo para cACAN generó una reacción positiva solamente con los granulocitos.

50

55

Ejemplos

Para llevar a cabo la presente invención, como se demuestra en los ejemplos, se utilizan los siguientes

procedimientos que además pretenden describir la invención mediante ejemplos prácticos y no representar una descripción limitante de la invención.

Pacientes:

- 5 Se recogieron muestras de suero de 10 pacientes con GW positiva para cACAN en IFI (positivas para PR3) y de 10 pacientes con otra VSAA positiva para pACAN (positiva para MPO) y se almacenaron a -20°C. El diagnóstico de GW se basó en las definiciones consenso de Chapel Hill para la GW. Como controles de enfermedad en el estudio se inscribieron diez pacientes que cumplían los criterios de diagnóstico para lupus eritematoso sistémico (LES). Como
10 controles sanos se usaron sueros de 10 donantes de sangre. Todas las muestras se extrajeron en el momento del consentimiento y la inscripción de los pacientes.

Detección de ACAN mediante IFI convencional:

- 15 Los ACAN se detectaron procesando muestras de pacientes sobre granulocitos humanos fijados con etanol y formalina de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Alemania). En resumen, los granulocitos fijados se incubaron en una cámara con humedad a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos con 25 µl de suero diluido de forma sucesiva, comenzando con una dilución de 1:20. Después del lavado, los inmunocomplejos se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de oveja anti-IgG humana
20 conjugados con fluoresceína durante 30 minutos a TA. Posteriormente, las muestras se lavaron, se fijaron y se analizaron manualmente por microscopía de fluorescencia.

Detección de anticuerpos contra MPO y PR3 mediante ELISA:

- 25 Los autoanticuerpos contra MPO y proteinasa 3 en los sueros de los pacientes se detectaron utilizando ELISA de diferentes generaciones empleando PR3 y MPO humanas purificadas como antígenos de fase sólida, respectivamente, de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes (GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Alemania; Aesku.Diagnostics GmbH, Wendelsheim, Alemania).

30 Detección simultánea de ACAN y anticuerpos para MPO y PR3:

- Se aislaron granulocitos humanos mediante un gradiente de densidad. Se recogió la banda enriquecida con granulocitos. Tras la lisis de los eritrocitos, se lavaron los granulocitos con PBS. Los granulocitos separados se mezclaron con perlas revestidas con MPO o PR3 marcadas con rodamina. Esta mezcla se inmovilizó sobre la
35 superficie de portaobjetos para diagnóstico de 6 pocillos fabricados de vidrio. Los portaobjetos se fijaron con etanol. Para la IFI, los portaobjetos combinados con granulocitos/perlas se incubaron en una cámara con humedad a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos con 25 µl de suero diluido a 1:20. Tras el lavado, los inmunocomplejos unidos se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con Cy5 (Dianova, Hamburgo, Alemania) durante 30 minutos a TA. Posteriormente, las muestras se
40 lavaron, se fijaron y se analizaron por el sistema de reconocimiento automático de patrones de señales de fluorescencia (véase a continuación).

Reconocimiento automatizado de patrones de señales fluorescentes:

- 45 Los patrones fluorescentes de las muestras de suero para la detección múltiple simultánea de anticuerpos unidos a antígenos celulares, y unidos a antígenos aplicados sobre micropartículas, se evaluaron automáticamente usando un microscopio invertido motorizado (Olympus IX81, Olympus Corp., Japón) con una platina de barrido motorizada (IM120, Märzhäuser, Alemania), diodos emisores de luz (LED) a 400 nm, 490 nm, 525 nm y 635 nm (precisExcite, CoolLED, RU), y una cámara de escala de grises (PS4, Kappa, Alemania). El sistema de interpretación se controlaba por un programa informático especialmente diseñado, que consistía en módulos para control de dispositivos y autoenfoco, análisis de imágenes, y algoritmos de reconocimiento de patrones. El novedoso autoenfoco basado en la caracterización de objetos por formación de imágenes de Haralick a través de la transición en una escala de grises usaba, como colorante fluorescente para el reconocimiento y el enfoque de los objetos, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Para eliminar artefactos, se realizó un análisis adicional de imágenes cualitativo
50 dividiendo la imagen en sub-objetos del mismo tamaño.

La segmentación de los objetos se realizó usando un algoritmo umbral basado en histograma seguido de transformación de Watershed. Los objetos segmentados se caracterizaron por descriptores regionales, topológicos y de textura/superficie. Se implementaron más de 1.400 criterios de descripción de objetos.

Los datos de imágenes por fluorescencia se evaluaron según la siguiente jerarquía: i) señal de tinción positiva, ii) localización de la tinción (celular o micropartícula), y iii) determinación de los patrones de tinción celular: perinuclear o citoplasmático.

5

Las células se identificaron por tinción con DAPI y las micropartículas por fluorescencia con rodamina. También se usó fluorescencia con FITC para identificar el sustrato sintético. Inmunofluorescencia específica de Cy5, para la unión específica de anticuerpos, se analizó en el tercer canal de fluorescencia. La clasificación se consiguió mediante la combinación de las características de estructura y textura mediante definición de reglas para cada objeto.

10

Para evaluar los datos de imágenes se calculó un índice de reactividad (IR) combinando la intensidad absoluta de la imagen, el contraste y el número de niveles de escala de grises del total de imágenes. Aunque el IR está influenciado por el tiempo de exposición, que depende de la señal de imágenes más elevada después de la exclusión de los artefactos, se podían detectar incluso patrones con señales absolutas débiles. La determinación de los valores umbral para la diferenciación de señales positivas se realizó basándose en valores del IR de 200 donantes de sangre normales.

15

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos no pretenden limitar el alcance de la invención.

20

Ejemplo 1: Detección simultánea de ACAN y anticuerpos para MPO

Para la detección simultánea de ACAN y anticuerpos para MPO, se inmovilizaron granulocitos humanos en suspensión con perlas revestidas con MPO en los pocillos de los portaobjetos para diagnóstico de 6 pocillos fabricados de vidrio. Los núcleos de los granulocitos se detectaron mediante tinción con DAPI, mientras que las perlas revestidas se localizaron marcando con rodamina. Para la IFI, los portaobjetos combinados con granulocitos/perlas se incubaron con suero diluido a 1:20. Después del lavado, los inmunocomplejos formados se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con Cy5.

30

Se analizaron los portaobjetos con granulocitos y perlas revestidas con MPO (figura 1). En el panel superior, se muestran imágenes de tinción de un suero pACAN tomadas con los tres canales diferentes: para DAPI (a la izquierda), FITC/rodamina (en el centro) y Cy5 (a la derecha). En el panel inferior, el portaobjetos combinado se tiñó con un suero cACAN. Solamente la imagen teñida con el suero pACAN mostraba también una tinción positiva para las partículas revestidas con MPO en el canal Cy5 específico. Por lo tanto, la tinción perinuclear de los granulocitos, que es típica de anticuerpos para MPO, se confirmó mediante la tinción de las perlas revestidas con MPO.

35

Ejemplo 2: Detección simultánea de ACAN y anticuerpos para PR3

Para la detección simultánea de ACAN y anticuerpos para PR3, se inmovilizaron granulocitos humanos en suspensión con perlas revestidas con PR3 en los pocillos de portaobjetos para diagnóstico de 6 pocillos fabricados de vidrio. Los núcleos de los granulocitos se detectaron por tinción con DAPI, mientras que las perlas revestidas se localizaron marcando con rodamina. Para la IFI, los portaobjetos combinados con granulocitos/perlas se incubaron con suero diluido a 1:20. Después del lavado, los inmunocomplejos formados se detectaron incubando las muestras con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con Cy5.

45

Se analizaron los portaobjetos con granulocitos y perlas revestidas con PR3 (figura 2). En el panel superior, se muestran imágenes de tinción de un suero pACAN tomadas con los tres canales diferentes: para DAPI (a la izquierda), FITC/rodamina (en el centro) y Cy5 (a la derecha). En el panel inferior, el portaobjetos combinado se tiñó con un suero cACAN. La figura 2 muestra las imágenes de tinción usando micropartículas revestidas con PR3, en vez de las partículas revestidas con MPO como en el ejemplo 1. A diferencia del ejemplo 1, el suero cACAN demuestra una reacción positiva con las perlas revestidas con PR3 en el panel inferior. Por lo tanto, la tinción citoplasmática de los granulocitos típica de los anticuerpos para PR3 se confirmó mediante la tinción de las perlas revestidas con PR3.

50

Ejemplo 3: Evaluación de sueros específicos de enfermedad y de control

Con el fin de ensayar la especificidad de la detección de anticuerpos ACAN, anti-PR3 y anti-MPO mediante IFI en portaobjetos tanto con granulocitos como con micropartículas revestidas con antígeno, se evaluó el suero de 10

pacientes con GW anti-PR3 positivos, el suero de 10 pacientes con VSAA anti-MPO positivos, el suero de 10 pacientes con LES, y el suero de 10 donantes de sangre. El diagnóstico de GW se basaba en las definiciones consenso de Chapel Hill para la GW. En el estudio, se inscribieron diez pacientes que cumplían los criterios de diagnóstico de LES como controles de enfermedad. Los sueros de 10 donantes de sangre se utilizaron como 5 controles sanos.

La reactividad de ACAN se determinó de acuerdo con el patrón de inmunofluorescencia de tinción positiva de granulocitos. La reactividad a las micropartículas revestidas con MPO o con PR3 se evaluó simultáneamente mediante detección de tinción positiva de micropartículas.

10

Casi todos los sueros GW que fueron positivos a cACAN en IFI, revelaron una reactividad positiva con las perlas revestidas con PR3 (90%) y un patrón cACAN con granulocitos fijados (100%) del portaobjetos combinado. Por el contrario, todos los sueros VSAA que fueron positivos para pACAN en IFI, demostraron una reactividad positiva con las perlas revestidas con MPO y un patrón pACAN con granulocitos fijados. Todos los pacientes de control fueron 15 negativos con los granulocitos fijados o las micropartículas revestidas de antígeno. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Estudios adicionales que usan el procedimiento de la presente invención para diagnosticar enfermedades asociadas con AAN revelan resultados similarmente eficaces.

20

Tabla 6.

Detección simultánea de ACAN en granulocitos y anticuerpos para MPO y PR3 en perlas revestidas con antígeno				
	granulocitos		macropartículas	
	cACAN	pACAN	anti-PR3	anti-MPO
Pacientes de GW anti-PR3 pos.	10/10	0/10	9/10	0/10
Pacientes de VSAA anti-MPO pos.	0/10	9/10	0/10	10/10
Pacientes de LES	0/10	0/10	0/10	0/10
Donantes de sangre	0/10	0/10	0/10	0/10

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades que comprende la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o más sustratos sintéticos, **caracterizado por:**
- 5 a) proporcionar una mezcla de sustratos celulares y sintéticos, donde el sustrato sintético es una micropartícula o perla revestida con antígeno al que es capaz de unirse un anticuerpo a detectar, y donde el sustrato celular es una célula de mamífero, múltiples células de mamífero y/o tejido orgánico,
b) incubación de dicha mezcla de sustratos con una muestra obtenida de un paciente que contiene el anticuerpo a detectar,
- 10 c) detección y/o identificación de sustratos celulares y sintéticos y anticuerpos unidos a dichos sustratos usando microscopía de fluorescencia, y
d) evaluación de datos de imágenes de inmunofluorescencia.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el sustrato celular es células
- 15 HEp-2 y/o granulocitos humanos.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el sustrato sintético está revestido con antígeno nativo purificado y/o antígeno recombinante.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** al revestimiento antigénico del sustrato sintético se le unen anticuerpos asociados con la presencia de la enfermedad.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
- 25 **porque** las características ópticas, fluorescentes y/o físicas de los sustratos se usan para identificar dichos sustratos.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado porque** la característica fluorescente de concentración de fluoróforo, por ejemplo concentración de rodamina, y/o la característica física de
- 30 tamaño se usa para identificar el sustrato sintético, con lo que el tamaño de micropartícula está preferentemente entre 1-100 µm.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
- 35 **porque** se usa microscopía de fluorescencia multicolor para identificar dichos sustratos y/o autoanticuerpos unidos, con lo que sustratos y/o anticuerpos unidos muestran colores fluorescentes diferentes.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
- porque** la enfermedad es un trastorno autoinmunitario o infeccioso.
- 40 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
- porque** los anticuerpos a detectar son anticuerpos antinucleares (AAN) o anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ACAN).
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
- 45 **porque**
- los anticuerpos muestran tinción citoplasmática moteada (cACAN) de granulocitos humanos y se unen a proteinasa 3 (PR3), con lo que la proteína proteinasa 3 o sus antígenos están provistos sobre un sustrato sintético, proporcionando por lo tanto un diagnóstico de granulomatosis de Wegener (GW), o
 - los anticuerpos muestran tinción perinuclear (pACAN) de granulocitos humanos y se unen a mieloperoxidasa
- 50 (MPO), con lo que la proteína mieloperoxidasa o sus antígenos están provistos sobre un sustrato sintético, proporcionando por lo tanto un diagnóstico de vasculitis asociada a ACAN (VSAA).
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
- porque** la evaluación de datos de imágenes de inmunofluorescencia se lleva a cabo usando un sistema de interpretación de reconocimiento de patrones automatizado, donde dicho sistema de interpretación está controlado mediante software diseñado especialmente, que consiste en módulos para control de dispositivos y autoenfoco, adquisición de imágenes, análisis de imágenes, y/o algoritmos de reconocimiento de patrones.
12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**

porque el sistema de interpretación se usa para evaluar los datos de imágenes de inmunofluorescencia de acuerdo con la siguiente jerarquía:

- i. señal de tinción positiva,
 - ii. localización de la tinción mediante clasificación de patrones de tinción en sustrato celular o sustrato sintético, y
 - 5 iii. determinación de patrones celulares seleccionados entre el grupo que consiste en patrones perinucleares y/o citoplásmaticos para granulocitos; patrones nucleares citoplásmaticos y/o cromatínicos de células mitóticas para células HEp-2.
13. Sistema para la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o
10 más sustratos sintéticos de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende
- a) un microscopio fluorescente con una cámara, una platina de exploración motorizada y diodos emisores de luz multicanal (LED),
 - b) un dispositivo informático con software que consiste en módulos para control de dispositivos y autoenfoco,
 - 15 adquisición de imágenes automatizada, análisis de imágenes automatizado, y algoritmos de reconocimiento de patrones automatizados con lo que se analizan canales de tres colores, y
 - c) una mezcla de sustratos celulares y sintéticos con una muestra que contiene el anticuerpo a detectar y permite la detección y/o identificación de sustratos celulares y sintéticos y anticuerpos unidos a dichos sustratos, donde el sustrato sintético es una micropartícula o perla revestida con antígeno al que es capaz de unirse un anticuerpo a
20 detectar, y donde el sustrato celular es una célula de mamífero, múltiples células de mamífero y/o tejido orgánico.
14. Sistema para la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o
25 más sustratos sintéticos de acuerdo con la reivindicación anterior, donde dicho sistema comprende software de reconocimiento de patrones que determina simultánea sustratos tanto celulares como sintéticos.
15. Kit para la detección simultánea de anticuerpos unidos a uno o más sustratos celulares y uno o más
sustratos sintéticos de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 1-12, que comprende
- a) Portaobjetos con sustrato celular fijado mezclado con el sustrato sintético revestido de anticuerpo, y los sustratos sintéticos se distinguen entre sí de acuerdo con sus características ópticas, fluorescentes y/o físicas, donde el
30 sustrato sintético es una micropartícula o perla revestida con antígeno al que es capaz de unirse un anticuerpo a detectar, y donde el sustrato celular es una célula de mamífero, múltiples células de mamífero y/o tejido orgánico, y
 - b) conjugado con un anticuerpo específico de inmunoglobulina conjugado con una etiqueta fluorescente, preferentemente FITC, Cy5 y/o APC.

35

Fig. 1

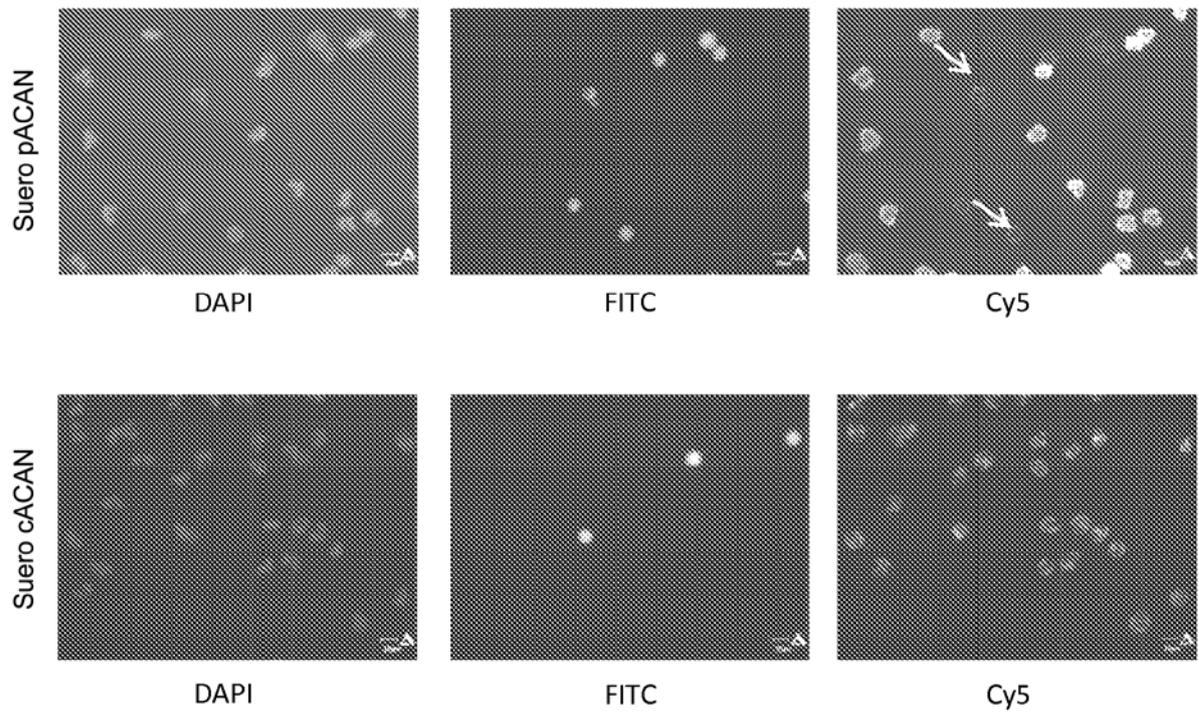


Fig. 2

