

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 251**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/125** (2006.01)

**C07K 14/085** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2011 PCT/EP2011/061001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12001098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011 E 11728285 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2588134**

54 Título: **Análisis de diagnóstico para diabetes tipo 1**

30 Prioridad:

**01.07.2010 EP 10305719**

**01.07.2010 EP 10305717**

**01.07.2010 EP 10305714**

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

**30.05.2017**

73 Titular/es:

**VACTECH OY (100.0%)**

**Biokatu 8**

**33520 Tampere, FI**

72 Inventor/es:

**HYÖTY, HEIKKI;**

**KNIP, MIKAEL;**

**LAITINEN, OLLI;**

**TOLONEN, OUTI;**

**HANKANIEMI, MINNA;**

**OIKARINEN, SAMI;**

**HONKANEN, HANNA-RIIKKA;**

**LECOUTURIER, VALÉRIE y**

**ALMOND, JEFFREY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 614 251 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

Análisis de diagnóstico para diabetes tipo 1

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un análisis de diagnóstico para diabetes tipo 1 (DT1), y especialmente a un análisis para predecir el riesgo de contraer la enfermedad. También se refiere a un método de seguimiento de la eficacia de los tratamientos antiviricos destinados a la prevención de DT1. La invención se refiere aún más a un equipo de diagnóstico.

**Antecedentes de la invención**

10 La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad grave que se ha vuelto cada vez más frecuente ya a una edad muy temprana. En la diabetes tipo 1 las células beta del páncreas se destruyen, lo que conduce a la carencia de insulina. Se cree que la destrucción de las células beta que es causada por una respuesta autoinmunitaria, que a su vez se supone que está provocada por una infección vírica.

15 La relación entre enterovirus y diabetes tipo 1 (DT1) se ha documentado en múltiples estudios. Se han detectado enterovirus en el páncreas, la sangre y la mucosa intestinal de pacientes con diabetes tipo 1 con más frecuencia que en los pacientes de referencia y estudios prospectivos han apoyado su función en el inicio del proceso de daño de las células beta relacionado con la diabetes tipo 1.

20 La diabetes tipo 1 se diagnostica normalmente basándose en los síntomas clínicos cuando el proceso de dañado de las células beta ya ha comenzado y la enfermedad se ha desencadenado. Sin embargo, con el fin de prevenir o poner de manifiesto el proceso de la enfermedad es deseable identificar pacientes en situación de riesgo de contraer DT1 en una fase temprana, mucho antes de los síntomas clínicos.

La asociación sugerida entre enterovirus y DT1 abre nuevas posibilidades para predecir el riesgo de contraer la enfermedad. Sin embargo, el problema es que el conocimiento acerca de qué serotipos pueden causar la enfermedad es limitado e incluso contradictorio.

25 El grupo de los enterovirus incluye más de 100 serotipos diferentes. Las infecciones por enterovirus son habitualmente asintomáticas, pero también pueden causar diversos tipos de enfermedades. Por ejemplo, poliovirus, virus coxsackie B (VCB), virus coxsackie A (VCA) y virus ECHO (E o Echo), así como enterovirus numerados son los enterovirus conocidos que están involucrados en el desarrollo de una variedad de enfermedades. El espectro de serotipos responsables varía mucho de una enfermedad a otra, e incluso en una enfermedad como la diabetes tipo 1 los serotipos exactos no han sido plena y fiablemente identificados.

30 De hecho, estudios previos que describen la asociación entre enterovirus y DT1 no pudieron discriminar entre serotipo o se restringieron a informes de casos. Algunos estudios han sugerido que los serotipos de VCB pueden ser importantes (Yoon *et al.*, 1979 *New Eng. J. Med.*, vol. 300, pág. 1173 ; Hindersson M., *et al.*, 2005, *J. Clin. Virol.* vol. 33 pág. 158; Dotta F. *et al.*, 2007, *PNAS* 104: 5115 ). Sin embargo, otros serotipos de enterovirus también se han descrito esporádicamente (Cabrera-Rode *et al.*, 2003, *Diabetologia*; Williams *et al.*, 2006, *J. Clin. Micro.* vol. 44 pág. 35 441).

Shibasakti *et al.*, 2010. *Endocrine Journal*, vol. 57(3): 211-219 expone la posible implicación de infecciones víricas incluidas entre otras CAV4-CAV6 en la patogenia de la diabetes tipo 1 fulminante, pero no se encuentra ninguna prueba directa para la función patógena de los virus en la destrucción de las células beta. La diabetes tipo 1 fulminante difiere de la diabetes tipo 1 clásica en que no está relacionada con una respuesta autoinmunitaria de los linfocitos T, sino con un proceso inflamatorio dominado por macrófagos provocado por virus.

40 En el documento WO01/00236 (Hyöty *et al.*) se encontraron los siguientes enterovirus no de poliomielitis en niños diagnosticados con diabetes tipo 1: serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de VCB, serotipos 3, 4, 6, 9, 11, 22 y 30 de virus echo, serotipos 9 y 16 de VCA. Sin embargo, no hay datos en cuanto a la función de cada uno de los serotipos enumerados, a excepción de algunos análisis en animales con VCB3. Una publicación más reciente documento 45 US2010/0047273 (Rappuoli *et al.*) encontró una asociación determinada entre VCB4 y la diabetes tipo 1.

Filippi *et al.*, 2008. *Diabetes* 57:2863-2871 es una reseña sobre la función de los enterovirus en la diabetes tipo 1. Se exponen los resultados obtenidos en ratones NOD que demuestran una relación entre VCB4 y la diabetes o ninguna relación entre VCB3 y la diabetes. Cabe esperar que puede haber una diferencia fundamental entre roedores y seres humanos a este respecto. La relación entre el virus y diabetes se dice que es sumamente compleja basándose en 50 los estudios en ratones. Se cree que determinados virus son capaces tanto de provocar como de prevenir la diabetes en el mismo modelo de ratón dependiendo del tiempo de infección.

Hyöty, 2009, *J. Med. Virol.* 81:197-198 da una visión general de la relación entre enterovirus y diabetes tipo 1. El efecto del riesgo de enterovirus no se confirmó en todos los estudios prospectivos.

Jaidane *et al.*, *Reviews in Medical Virology*, sep. 2010, vol. 20, nº 5, 21 de abril de 2010, páginas 265-280 es una

reseña sobre la relación entre los enterovirus y DT1.

Oikarinen *et al.*, *Diabetes*, vol. 60, nº 1, octubre de 2010, páginas 276-279 describe la detección de ARN de enterovirus en la sangre para evaluación de riesgos de DT1 en niños y llega a la conclusión de que los enterovirus pueden desempeñar una función en el inicio del proceso de lesión de las células beta.

- 5 Por el momento no hay consenso en la técnica anterior en cuanto al impacto de los serotipos de enterovirus en el desarrollo de la diabetes tipo 1. Todavía hay gran necesidad de desarrollar medios y métodos eficaces para predecir el riesgo de contraer diabetes tipo 1, y de diagnosticar la enfermedad en una fase temprana. También hay necesidad de controlar el efecto de los tratamientos antiviricos utilizados para la prevención de la diabetes tipo 1. La presente invención satisface estas necesidades.

## 10 Sumario de la invención

La presente invención radica en el descubrimiento sorprendente de que determinados serotipos de enterovirus son significativamente más diabetógenos que otros, y que, además hay serotipos que tienen un efecto opuesto, es decir muy protector sobre la diabetes tipo 1.

- 15 La inducción de resistencia a los virus heterotípicos ha sido previamente descrita por Landau B. J. *et al.*, *Microbial Pathogenesis* 1990:8 289-298 , pero no en relación con la diabetes. Dicha publicación describe un aumento de la resistencia contra la lesión del hígado, corazón y páncreas producidas por la infección por VCB1 en ratones vacunados con VCB3. Se descubrió que VCB3 produce daño subtotal en las células acinares pancreáticas, mientras VCB1 producía necrosis total de células acinares. Cuando los ratones vacunados con VCB3 se sometieron a la prueba de provocación con VCB1 no ocurrió aumento del daño a las células acinares pancreáticas existentes. De  
20 destacar, sin embargo, fue que se encontró que ni VCB3 ni VCB1 afectan a las células de los islotes productoras de insulina, es decir, las células beta del páncreas.

- Los presentes inventores han descubierto que los niños que habían estado en contacto con, por ejemplo VCB3 o VCB6 tenían un riesgo reducido de contraer diabetes tipo 1, mientras que otros que habían estado en contacto con, p. ej. VCB1 o VCB2 tenían mayor riesgo. VCB1 resultó estar significativamente más fuertemente relacionada con el  
25 riesgo de contraer diabetes tipo 1 que cualquier otro serotipo de enterovirus. Por primera vez se ha demostrado la relación entre infección por determinados serotipos de enterovirus y la aparición de DT1 en seres humanos, en un extenso estudio prospectivo de casos de referencia. Llama la atención que entre todos los serotipos estudiados los que presentaban el riesgo o efecto protector más marcados pertenecían al grupo VCB. Esto es aún más sorprendente cuando se tiene en cuenta el bajo número de serotipos VCB (seis).

- 30 El hallazgo de la división de enterovirus en serotipos protectores y de riesgo abre nuevas implicaciones del diagnóstico en la predicción de la diabetes tipo 1.

La presente invención proporciona un análisis de diagnóstico para evaluar el riesgo de diabetes tipo 1 (DT1) que comprende determinar la presencia de al menos un riesgo o al menos un serotipo de enterovirus protector en una muestra corporal, por lo que:

- 35 la presencia de al menos un serotipo de riesgo seleccionado del grupo que consiste en VCB1, VCB2, Echo3, Echo14, Echo18, Echo29, Echo32, VCA4, VCA5, VCA6, y VCA16 indica un mayor riesgo de contraer DT1, o la presencia de al menos un serotipo protector seleccionado del grupo que consiste en VCB3, VCB4, VCB5, VCB6, Echo11, y Echo13 indica un menor riesgo de contraer DT1.

- 40 La presente invención proporciona además un método para el seguimiento de la eficacia de los tratamientos antiviricos destinados a la prevención de la DT1, que comprende proporcionar una muestra de un paciente que ha recibido tratamiento antivirico, y determinar la presencia de al menos un riesgo o al menos un serotipo de enterovirus protector en la muestra, por lo que

- 45 la presencia de al menos un serotipo de riesgo seleccionado del grupo que consiste en VCB1, VCB2, Echo3, Echo14, Echo18, Echo29, Echo32, VCA4, VCA5, VCA6 y VCA16 indica que el tratamiento no ha reducido el riesgo de contraer DT1, o

la presencia de al menos un serotipo protector seleccionado del grupo que consiste en VCB3, VCB4, VCB5, VCB6, Echo11 y Echo13 indica que el tratamiento ha reducido el riesgo de contraer DT1.

- Aún más, la invención proporciona la utilización *in vitro* de un equipo de diagnóstico en donde el equipo comprende medios para determinar la presencia de al menos un riesgo y al menos un serotipo de enterovirus protector en una  
50 muestra corporal, por lo que el serotipo de riesgo se selecciona del grupo que consiste en VCB1, VCB2, Echo3, Echo14, Echo18, Echo29, Echo32, VCA4, VCA5, VCA6, y VCA16, y el serotipo protector se selecciona del grupo que consiste en VCB3, VCB4, VCB5, VCB6, Echo11 y Echo13.

Algunas realizaciones preferidas de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes. Otros objetos, detalles y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes dibujos, descripción

detallada y ejemplos.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el análisis de regresión logística condicional para 41 virus en la fecha de seroconversión de autoanticuerpos.

- 5 La figura 2 muestra un compendio de los criterios estrictos y aproximados de los análisis de la franja de tiempo de VCB1, VCB3 y VCB6.

La figura 3 muestra un riesgo atribuible a la población (RAP) combinada para VCB1 y VCB2.

La figura 4 muestra el % de RAP protector para VCB3 y VCB6 usando clases positivas frente a negativas (0-3 frente a 4).

- 10 La figura 5 muestra la duración de la excreción del virus.

La figura 6 muestra la relación de la infección por enterovirus y las muestras en las clases de edad.

La figura 7 muestra la relación de todas las infecciones por enterovirus y muestras (recuadro superior) y las infecciones y muestras antes de la aparición de autoanticuerpos (AAB) (recuadro inferior).

### Descripción detallada de la invención

- 15 Si no se indica de otro modo "diabetes tipo 1" o "DT1" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la forma clásica de la enfermedad, que está relacionada con la aparición de autoanticuerpos contra las células beta pancreáticas. Esta enfermedad también puede denominarse "diabetes tipo 1 clásica" para distinguirse de la "diabetes tipo 1 fulminante", que es una forma rara de diabetes que está relacionada con un proceso inflamatorio por macrófagos, que no implica a anticuerpos autoinmunitarios.

- 20 Los grupos de riesgo típicos para contraer DT1 son los niños con diabetes en familiares de primer grado, los niños que dieron positivo a autoanticuerpos relacionados con la diabetes y los niños con alelos con riesgo genético para la enfermedad.

- El análisis de diagnóstico de la invención comprende la determinación de la presencia de al menos un riesgo y/o serotipo de enterovirus de protección. Los serotipos de riesgo tal como se utilizan en este contexto también pueden denominarse serotipos diabetógenos. El grupo de los enterovirus de riesgo consiste en los serotipos VCB1, VCB2, Echo3, Echo14, Echo18, Echo29, Echo32, VCA4, VCA5, VCA6 y VCA16. El análisis puede comprender la determinación de cualquier combinación de dichos virus de riesgo. La presencia de VCB1 y / o VCB2 es especialmente indicativo de un mayor riesgo. Según una realización de la invención se determina la presencia de al menos VCB1 o de VCB1 y VCB2. Según otra realización de la invención, se determina al menos uno de VCB1, VCB2, CVB3, CVB4, CVB5 y VCB6. Según aún otra realización, se determina la presencia de al menos tres de VCB1, VCB2, Echo32, Echo29 y Echo14, o se determinan los dichos cinco serotipos. Según otra realización se determinan los once serotipos de riesgo.
- 25
- 30

- El grupo de enterovirus protectores consiste en los serotipos VCB3, VCB4, VCB5, VCB6, Echo11 y Echo13. El análisis puede comprender la determinación de cualquier combinación de dichos virus protectores. La presencia de VCB3 y/o VCB6 es especialmente indicativa de un riesgo reducido de DT1. Por el contrario, la ausencia de un serotipo protector también puede indicar un mayor riesgo de contraer DT1. Según una realización de la invención, se determina la presencia de al menos VCB3 y/o VCB6. Según otra forma de realización se determina la presencia de los seis enterovirus protectores.
- 35

- En una realización preferida de la invención se determina la presencia de al menos un enterovirus de riesgo y al menos un enterovirus protector. Normalmente, se determina la presencia de al menos VCB1, VCB2, VCB3 y VCB6. Según una realización, se determina la presencia de al menos VCB1, VCB2, Echo32, Echo29, Echo14, VCB3, VCB6, Echo11 y Echo13. También es posible cualquier otra combinación de virus de riesgo y protectores. En una realización, se determinó la presencia de los doce serotipos de riesgo y los cuatro serotipos protectores.
- 40

- El análisis de diagnóstico para evaluar el "riesgo de diabetes tipo 1" se puede usar para predecir el riesgo de contraer DT1 o un proceso autoinmunitario perjudicial para las células beta, para el diagnóstico de DT1 o un proceso autoinmunitario perjudicial para las células beta en un paciente, o para la pronóstico de la enfermedad. Por lo tanto, la presencia de un enterovirus de riesgo indica un mayor riesgo de contraer DT1, o una DT1 ya en curso, o un mal pronóstico de la enfermedad, mientras que la presencia de un enterovirus protector indica un menor riesgo de contraer DT1, o un buen pronóstico de la la enfermedad, especialmente si el proceso autoinmunitario no ha comenzado todavía, o si el proceso autoinmunitario no ha avanzado hasta DT1 clínica. Incluso cuando se ha hecho el diagnóstico, el pronóstico en el sentido de gravedad de la enfermedad puede ser mejor. La presencia de al menos un serotipo de riesgo junto con al menos un serotipo protector, indica un riesgo más pequeño o mejor pronóstico para DT1 que la presencia de al menos un serotipo de riesgo en ausencia de cualquier serotipo protector.
- 45
- 50

El tiempo y el orden de la infección también tiene una influencia sobre el riesgo o pronóstico. El análisis de diagnóstico puede llevarse a cabo en muestras tomadas en diferentes momentos, por lo que la presencia de un serotipo protector antes de la presencia de un serotipo de riesgo en un sujeto indica un riesgo menor de DT1 que en el orden contrario.

- 5 El análisis de diagnóstico puede llevarse a cabo en muestras corporales de pacientes muy jóvenes, tal como en una muestra de sangre del cordón umbilical de un recién nacido, o en otros tipos de muestras desde bebés a partir de la edad de alrededor de 12 semanas o antes. Según una realización, el análisis se lleva a cabo en muestras de niños a la edad de aproximadamente 6, 12, 18 y 24 meses. El análisis puede llevarse a cabo como un método de detección en muestras de una cohorte completa, o de una subpoblación que tiene mayor riesgo de presentar diabetes tipo 1. Dichos grupos de alto riesgo pueden incluir las madres o los niños con riesgo genético otorgado por HLA (HLA-DR3 y/o DR4), pacientes con diabetes tipo 1 en familiares de primer o segundo grado o pacientes que dieron positivo a dos o más autoanticuerpos asociados a la diabetes. Por lo general la muestra corporal es de un paciente que se sospecha que ha desarrollado DT1 o un proceso autoinmunitario perjudicial para las células beta.

- 15 El análisis de diagnóstico comprende la determinación de la presencia de determinados serotipos de enterovirus en una muestra corporal. "La determinación de la presencia", como se emplea en este contexto abarca ambos medios directos e indirectos de mostrar una infección en curso o en el pasado. Convenientemente, la presencia del enterovirus se determina detectando uno de sus componentes, o una respuesta inmunitaria al mismo. El componente puede ser una estructura de dicho virus, p. ej. un ácido nucleico o un polipéptido codificado, tal como VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C o 3D, o partes del mismo. La respuesta inmunitaria puede medirse determinando un anticuerpo o un linfocito T que reconoce específicamente el polipéptido vírico. El análisis puede usarse para identificar una infección persistente o aguda por serotipos de riesgo o protectores. La determinación de una respuesta inmunitaria también puede poner de manifiesto infecciones pasadas en el paciente. El virus también puede detectarse mediante cultivo.

- 20 La muestra corporal a ensayar puede ser cualquier muestra del cuerpo, en donde el virus o la respuesta inmunitaria está presente, tal como una muestra de sangre, saliva, heces o de tejido. La presencia del virus puede determinarse, p. ej., en una muestra de heces por PCR, o anticuerpos contra el virus pueden determinarse en una muestra de sangre tomada del paciente a analizar, por ejemplo, mediante un análisis de inhibición de la placa o un análisis de microneutralización de la muestra de suero o plasma como se describe en los ejemplos. Además, el virus puede detectarse en diversos tejidos usando, p. ej. RT-PCR, hibridación *in situ* o inmunohistoquímica.

- 30 Según una realización, la presencia del virus se determina por PCR, RT-PCR, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, detección de antígenos usando EIA u otros métodos, aislamiento de virus, secuenciación, microscopía electrónica o microscopía inmunoelectrónica. Según otra realización, la presencia del virus se determina detectando una respuesta inmunitaria contra el virus mediante la medición de respuesta de anticuerpos específicos al virus, p. ej., por análisis de neutralización o de otros análisis de anticuerpos, o midiendo la respuesta inmunitaria mediada por células al virus p. ej., usando ensayos de proliferación de linfocitos T o de otros métodos de medición de inmunidad mediada por células, o mediciones de activación del sistema inmunitaria innato.

- 40 El análisis puede ser utilizado para detectar un perfil de alto o bajo riesgo de anticuerpos en suero, sangre, saliva o heces utilizando seroneutralización contra serotipos de riesgo y protectores. También puede ser utilizado para detectar estructuras de virus específicas para serotipos de alto riesgo y protectores en tejidos y sangre. Se puede además utilizar para la detección del genoma vírico de serotipos de riesgo o protector en hibridación *in situ* con sondas específicas. El análisis puede ser utilizado aún más en la PCR, que amplifica específicamente el genoma de los virus de riesgo o protectores, o en la hibridación con sondas de oligonucleótidos para detectar amplicones de PCR específicos para serotipos de riesgo y protectores. Otros métodos comprenden la secuenciación de una secuencia de proteína a partir de tejidos para identificar serotipos de riesgo y protectores, o el aislamiento del virus para detectar los serotipos de riesgo y protectores.

- 50 "Seroneutralización" es un análisis, en el que se determina la capacidad de los anticuerpos específicos de un virus dado posiblemente presentes en una muestra corporal para inhibir la multiplicación del virus dado. Puede medirse como la reducción del número de placas en comparación con una muestra de referencia en el cultivo celular. Los enterovirus forman placas en cultivos celulares sensibles a virus. Esta capacidad para formar placas puede utilizarse en el análisis de los anticuerpos de enterovirus. Los anticuerpos de enterovirus de serotipo específico presentes, p. ej. en el suero o el plasma neutralizan los enterovirus y evitan o reducen la formación de placa. En este análisis, una dilución definida de muestra en estudio se mezcla con un volumen equivalente de enterovirus de valor conocido, esta mezcla se añade a las células y la presencia de anticuerpos de enterovirus se detecta por reducción en el número de placas en comparación con el virus no neutralizado.

- 55 Los métodos de diagnóstico para determinar la presencia de los serotipos de riesgo o protectores es también útil en el seguimiento de la eficacia de los tratamientos antivíricos destinadas a la prevención de DT1. El tratamiento antivírico puede ir dirigido a la erradicación o prevención de infecciones con dichos virus, o a la prevención del proceso autoinmunitario que daña las células beta. Dicho tratamiento antivírico puede ser, p. ej. el tratamiento con aglutinantes de la cápside, inhibidores de proteasa, análogos de nucleósidos, inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales o interferón alfa y beta.

El equipo de diagnóstico para su uso en el análisis de diagnóstico o el procedimiento de seguimiento de la eficacia del tratamiento antivírico puede comprender cualquier reactivo necesario para la determinación de serotipos de enterovirus concretos que han de determinarse. Opcionalmente, el equipo también contiene instrucciones de uso.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no restrictivos.

5 Ejemplo 1

En el presente estudio se identificaron serotipos diabetógenos midiendo anticuerpos neutralizantes en el suero y tipificando virus directamente de las muestras de heces en niños que fueron observados en un estudio prospectivo de cohortes de natalidad. Las muestras de suero se obtuvieron de una amplia serie de niños mientras que las muestras de heces se obtuvieron a partir de una cohorte más pequeña. De este modo, los datos principales en este estudio están basados en el análisis sérico mientras que las muestras de heces proporcionaron información sobre los enterovirus circulantes y permitieron su aislamiento para la neutralización de los análisis de anticuerpos.

Análisis de seroneutralización

Se analizaron anticuerpos neutralizantes contra un amplio grupo de diferentes serotipos de enterovirus en la misma muestra de suero que fue la primera muestra positiva de autoanticuerpos tomada durante el seguimiento prospectivo. Por lo tanto, este momento representa el inicio del proceso que daña las células beta. Además, se cuantificaron los anticuerpos contra esos serotipos que se encontraron interesantes en esta identificación sistemática inicial en los puntos de tiempo adicionales para estudiar el momento de las infecciones y su relación con el inicio del proceso que daña las células beta.

En conjunto, los análisis de seroneutralización se realizaron utilizando 44 muestras de virus y 522 de suero/plasma (174 tripletes, dos niños de referencia por cada caso de niño). Con el fin de estudiar el efecto de la variación de la cepa, se han analizado dos serotipos (VCB4 y Echo3) usando tanto las cepas naturales (wt) recién aisladas como las cepas (rs) correspondientes de referencia (ATCC).

Los virus se analizaron en análisis de seroneutralización utilizando muestras con la fecha de seroconversión de autoanticuerpos. Los virus fueron VCA4, VCA5, VCA10, VCA16, VE71, VCA9, VCB1, VCB2, VCB3, VCB4-wt, VCB4-rs, VCB5, VCB6, Echo1, Echo2, Echo3-wt, Echo3-rs, Echo4, Echo5, Echo6, Echo7, Echo9, Echo11, Echo12, Echo13, Echo14, Echo15, Echo17, Echo18, Echo19, Echo20, Echo21, Echo25, Echo26, Echo27, Echo29, Echo30, Echo32, Echo33, VE74, VE78 y VE94.

Los análisis de seroneutralización se llevaron a cabo usando un análisis de neutralización en placa ( Roivainen M., Knip M., Hyöty Hh, Kulmala P., Hiltunen M., Vähäsalo P., Hovi T., A Åkerblom H. K. 1998. Varios serotipos de enterovirus diferentes pueden estar asociados a episodios autoinmunitarios prediabéticos y el comienzo de IDDM manifiesta. Childhood Diabetes in Finland (DIME) Study Group. *J. Med. Virol.* 56:74-78). En este análisis se determinó la capacidad del suero/plasma para inhibir la capacidad de un determinado virus para formar placas en las capas de células en comparación con las referencias, en las que se ha utilizado suero de ternera fetal en lugar de suero humano. En el análisis la inhibición se ha considerado significativa (resultado positivo, ++) cuando ha sido superior al 85%. El intervalo de inhibición entre 85-75% se ha considerado positiva débil (+) y la inhibición inferior al 75% ha sido interpretado como resultado negativo. Debido a que estos análisis se han realizado utilizando dos diluciones de suero/plasma diferentes (1/4 y 1/16) los resultados se han combinado utilizando la clasificación mostrada a continuación.

Clase	1:4	1:16
Máx. positivo (0)	++	++
Muy positivo (1)	++	+
Moderadamente positivo (2)	++	-
Positivo (3)	+	-
Negativo (4)	-	-

Resultados de la seroneutralización

40 Los datos en bruto se exportaron al paquete Stata y se analizaron empleando modelos de regresión logística condicional para evaluar el riesgo de determinados serotipos de producir DT1. Los resultados del análisis de regresión logística condicional se dan como relaciones de probabilidades (RP). Si la RP en determinados análisis es mayor que 1 y el límite inferior del intervalo de confianza (IC en el 95%) se mantiene por encima de 1 el virus puede considerarse como que confiere riesgo de DT1. Por otra parte, si tanto la RP como el límite superior del IC en el 95%

es inferior a 1, puede considerarse a dicho serotipo protector frente a DT1. En tales casos en que RP es superior o inferior a 1 y también el IC del 95% incluye valores a ambos lados de 1, el resultado no es estadísticamente significativo ( $P > 0,05$ ). En la Tabla 1 se presentan los valores de RP e IC para los virus más interesantes.

5 Tabla 1. Valores de RP e IC de los serotipos más interesantes. Los resultados estadísticamente significativos están en negrita.

Virus	[RP (IC)]	[RP (IC)]	[RP (IC)]	
	0-3 frente a 4	0-1 frente a 2-4	0-2 frente a 4	0-1 frente a 4
VCB1	<b>1,50 (1,02-2,23)</b>	1,10 (0,65-1,87)	1,56 (0,94-2,58)	1,39 (0,68-2,85)
VCB3	<b>0,39 (0,18-0,82)</b>	0,56 (0,24-1,34)	<b>0,36 (0,15-0,85)</b>	0,50 (0,21-1,20)
VCB6	<b>0,64 (0,41-0,97)</b>	0,57 (0,21-1,59)	0,86 (0,50-1,51)	0,49 (0,16-1,57)

Los resultados para los virus probados se muestran en la figura 1 para los datos de toda la cohorte, clases de 0-3 frente a 4.

También se calculó la prevalencia de anticuerpos (porcentaje de niños que tienen anticuerpos neutralizantes frente a cada serotipo del virus).

- 10 Se descubrió que especialmente VCB3 y VCB6 son serotipos protectores, mientras que especialmente VCB1 es un serotipo de riesgo claro para la diabetes tipo 1. Estas asociaciones se elaboraron en primer lugar a partir de los resultados de seroneutralización de un solo momento transversal que representa la primera muestra positiva de autoanticuerpos, y se confirmaron después en los análisis de múltiples puntos de tiempo en los que se analizó con más detalle el momento de las infecciones. En estos análisis de múltiples momentos el resultado más claro fue la
- 15 fuerte asociación del efecto de riesgo del VCB1 en el intervalo de tiempo de seis meses inmediatamente anterior a la primera detección de autoanticuerpos relacionados con la diabetes tipo 1. Otros serotipos VCB aparte de VCB1, VCB3 y VCB6 no presentaron dicho riesgo claro o efecto protector en el análisis de un solo momento llevado a cabo en la seroconversión de autoanticuerpos.

Análisis de seroneutralización en múltiples puntos de tiempo con VCB1, VCB3 y VCB6

- 20 Para aclarar el posible orden y el momento de las infecciones con VCB1, VCB3 y VCB6, se seleccionaron los siguientes puntos de tiempo para los análisis de seroneutralización:
- 12 meses antes de la seroconversión de autoanticuerpos
  - 6 meses antes de la seroconversión de autoanticuerpos
  - punto (primera detección de autoanticuerpos, estas muestras fueron analizadas con anterioridad)
- 25
- 12 meses después de la seroconversión de autoanticuerpos
  - momento del diagnóstico de la diabetes tipo 1

Según este plan se identificaron, recogieron, anonimizaron y analizaron aproximadamente 1.250 nuevas muestras que cumplen los criterios anteriores.

- 30 Todas las muestras se identificaron utilizando diluciones 1/4 y 1/16 de suero. En este informe la comparación de clase 03 frente a 4 y los análisis de sensibilidad 1 y 2 se ha utilizado generalmente, excepto en los análisis con criterios estrictos (explicados a continuación) en los que las infecciones se diagnosticaron por juicios subjetivos realizados por dos investigadores independientes sobre la base de criterios prefijados enumerados a continuación para la infección aguda:

35 La infección aguda se diagnosticó según los criterios siguientes que tenían que ser ciertos para una infección clasificada:

- Una seroconversión desde valor 0 a valor 4 o mayor
- El valor es 16 en al menos una de las siguientes muestras
- Todas las muestras de seguimiento siguen siendo positivas

Todos los análisis se realizaron a ciegas, sin conocimiento del estado del caso de referencia del niño.

Anticuerpos y anticuerpos maternos que alcanzan un máximo temporalmente

Los datos acumulados de nuevos puntos de tiempo en relación con VCB1, VCB3 y VCB6 mostraron claramente que las diluciones 1/4 y 1/16 previamente analizadas en el momento de la seroconversión para positividad de autoanticuerpos no proporcionan toda la imagen de los antecedentes de la infección de todos los niños. Cuando se tienen en cuenta estos nuevos datos de puntos de tiempo, se vieron aumentos transitorios en los valores de anticuerpos frente a estos tres serotipos ya sea por separado o en diferentes combinaciones en muchos niños. Estos aumentos transitorios pueden tener diferentes explicaciones: En algunos casos son claramente restos de anticuerpos maternos. En otros casos, el motivo puede ser la reactividad cruzada del anticuerpo entre serotipos estrechamente relacionados. Este problema se ha estudiado más a fondo en un subestudio por separado. Además, es posible que la cepa del virus utilizada en el ensayo de neutralización sea antigénicamente diferente de la que causa la infección, y entonces no puede detectar valores bajos de anticuerpos. Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad poco probable de que algunas muestras también pueden contener otras sustancias aparte de los anticuerpos que pueden inhibir el crecimiento del virus. Por último, siempre hay una posibilidad de variación en el rendimiento del análisis debido a razones técnicas.

15 Cómo hacer frente a este dilema? Los autores han abordado este problema mediante una estrategia de tres vertientes:

1. minimizar la influencia de los negativos erróneos = criterios flexibles
2. minimizar la influencia de positivos erróneos = criterios estrictos
3. eliminar el efecto de los anticuerpos maternos, de otra manera, como criterios flexibles = criterios medios

20 El método con criterios flexibles significa que básicamente todos los resultados de los diferentes puntos de tiempo han sido aceptados y analizados como son. En el método con criterios medios todos los demás resultados han sido aceptados, excepto los que posiblemente hayan sido influenciados por los anticuerpos maternos. En el método con criterios estrictos los autores han ido con cuidado a través de los datos y han extraído sólo aquellas infecciones que cumplen los criterios previamente establecidos de infección aguda.

25 Análisis estadísticos de múltiples momentos

Todos los análisis estadísticos presentados se basan en análisis de regresión logística condicional. Se realizaron tres tipos de análisis para este conjunto de datos. 1) Se determinó el momento de las infecciones y se analizó la relación temporal entre las infecciones y aparición de autoanticuerpos. En otras palabras, la frecuencia de infecciones entre los casos de los niños se comparó con la de los niños de referencia en cada intervalo de tiempo por separado. 2) El orden mutuo de las infecciones por VCB1, VCB3 y VCB6 se analizó por separado en casos y niños de referencia y también se analizaron las interacciones entre los tres serotipos. 3) Los resultados de nuevos puntos de tiempo se analizaron de manera similar como se describió anteriormente comparando casos y referencias en cada momento por separado. Estos análisis se llevaron a cabo en todo el grupo y en diferentes subgrupos según la lista siguiente:

- 35
- Conjunto de datos totales de toda la cohorte
  - Sexo
  - Años
  - Genotipo HLA
  - Área de residencia
- 40
- Combinaciones de diferentes AAB en ciertas muestras de seguimiento
  - Diagnóstico de diabetes
  - Efecto protector acumulativo

Se han llevado a cabo análisis de seroneutralización de estos tres virus utilizando un análisis de neutralización en placa como se ha descrito anteriormente.

45 Se realizaron análisis estadísticos en métodos con criterios flexibles y medios según las clases combinadas 0-3 frente a 4 y también se utilizaron análisis de sensibilidad, en los que la clase 3 (análisis de sensibilidad 1) o ambas clases 2 y 3 (análisis de sensibilidad 2) se eliminan del conjunto de datos. En el método con criterios estrictos los análisis de sensibilidad no se realizaron debido a su carácter intrínseco de "sensibilidad".

50 Se detectaron anticuerpos contra células de los islotes por inmunofluorescencia indirecta, y se determinaron anticuerpos contra insulina, ácido glutámico descarboxilasa, y proteína similar a la proteína tirosina fosfatasa (IA-2)



por análisis de *radiobinding* específicos de una muestra de suero utilizando métodos normalizados. Si se detectaban dos de estos cuatro autoanticuerpos, el paciente era considerado positivo al autoanticuerpo ( Nántö-Salonen *et al*, 2008. Lancet 372: 1746-1755).

Momento de las infecciones

- 5 El momento de las infecciones causadas por los tres serotipos VCB de interés se planteó de la siguiente manera: En primer lugar, las infecciones reconocidas se clasificaron en diferentes intervalos de tiempo con respecto a la fecha de seroconversión a positividad de autoanticuerpos (fecha AAB+). Los intervalos utilizados fueron los siguientes:
0. Sin infecciones o infección después de la fecha de AAB+
  1. Infección más de 12 meses antes de la fecha de AAB+
  - 10 2. Infección entre 12 y 6 meses antes de la fecha de AAB+
  3. Infección 6 meses antes de la fecha de AAB+

Además de utilizar estos intervalos de tiempo por separado, también se realizaron análisis por combinación de algunos de estos intervalos.

- 15 En el método con criterios flexibles el primer resultado positivo se aceptó como una infección, independientemente de la posibilidad de anticuerpos maternos o la posibilidad de que los resultados de las muestras de puntos de tiempo posteriores se vuelvan negativos. El método con criterios medios se realizó de manera similar, excepto que los resultados que fueron sesgados por los anticuerpos maternos identificados se anularon. Este dictamen lo realizaron dos expertos independientes que evaluaron los datos cuidadosamente y descartaron los resultados en los que los anticuerpos maternos podrían ser la causa de la positividad. En el método con criterios estrictos se aplica el
- 20 procedimiento de dictamen similar. En resumen, las infecciones agudas según los criterios estrictos fueron las siguientes:
- una seroconversión de título 0 a título 4 o superior
  - el título es 16 en al menos una de las siguientes muestras
  - todas las muestras de seguimiento siguen siendo positivas

- 25 Además de utilizar estos intervalos de tiempo por separado, también se realizaron análisis combinando algunos de estos intervalos.

- El momento de las infecciones producidas por el serotipo de riesgo VCB1 en estos intervalos de tiempo se resume en las Tablas 2 y 3. Estos análisis se realizaron utilizando los criterios flexibles y criterios medios y el efecto de riesgo de infección se analizó comparando su frecuencia en diferentes intervalos de tiempo al del intervalo cero
- 30 (véase anteriormente). Se realizaron análisis estadísticos básicos, es decir, clases 0-3 frente a 4 y análisis de sensibilidad 1 y 2.

Tabla 2. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB1, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios flexibles con las clases 0-3 frente a 4 y análisis de sensibilidad 1 y 2.

VCB1	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,77	0,064	0,97	3,25
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	<b>2,24</b>	<b>0,007</b>	<b>1,25</b>	<b>4,00</b>
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	<b>3,56</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,92</b>	<b>6,62</b>
<b>Sensibilidad 1, Clase 0-2 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,89	0,724	0,46	1,72
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,25	0,468	0,68	2,31
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	<b>2,19</b>	<b>0,018</b>	<b>1,15</b>	<b>4,17</b>
<b>Sensibilidad 2, Clase 0-1 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,19	0,684	0,51	2,79
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,98	0,950	0,47	2,03
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,09	0,067	0,95	4,59

Tabla 3. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB1, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios medios con las clases 0-3 frente a 4 y análisis de sensibilidad 1 y 2.

VCB1	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente al 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,62	0,262	0,70	3,75
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,77	0,417	0,41	1,44
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	<b>2,09</b>	<b>0,002</b>	<b>1,32</b>	<b>3,33</b>
<b>Sensibilidad 1, Clase 0-2 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,14	0,795	0,41	3,17
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,66	0,307	0,30	1,46
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	<b>2,10</b>	<b>0,007</b>	<b>1,23</b>	<b>3,57</b>
<b>Sensibilidad 2, Clase 0-1 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,70	0,629	0,16	3,02

12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,36	0,078	0,11	1,12
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,44	0,342	0,68	3,05

Curiosamente, en estos análisis, las infecciones por VCB1 se encuentran claramente con mayor frecuencia en el caso de los niños según la hipótesis de riesgo con infecciones que se producen próximas en el momento de la seroconversión de autoanticuerpos (en el intervalo de tiempo de 6-0 meses antes de la fecha de AAB+). El resultado es el mismo en todos los análisis, excepto que en el análisis de sensibilidad 2 se pierde la significación estadística. Debido a que en este análisis los autores han aceptado todos los resultados positivos de anticuerpos (probablemente incluidos resultados de falsos positivos), excepto los anticuerpos maternos en análisis de criterios medios, es esencial comparar estos resultados con los obtenidos utilizando criterios estrictos para las infecciones (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB1, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios estrictos.

VCB1	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,67	0,455	0,24	1,89
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,38	0,491	0,55	3,46
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	<b>3,76</b>	<b>0,001</b>	<b>1,68</b>	<b>8,44</b>

En este análisis, se ha eliminado una gran cantidad de datos para excluir todos los posibles positivos erróneos. Los resultados demuestran que una curva de respuesta a dosis creíble se observa poniendo de relieve la importancia del intervalo de tiempo de 6-0 meses antes de la fecha de AAB+ y demostrando un efecto de riesgo definido de VCB1 con resultado estadístico convincente. Lo más importante, debido a los mismos 6-0 meses antes del intervalo de la fecha AAB+ se observó que es estadísticamente significativa tanto en los métodos con criterios flexibles, medio como estricto, estos resultados consolidan este período como crítico para la infección por VCB1 como un riesgo para provocar DT1. Los resultados de los criterios estrictos y de los criterios flexibles se presentan juntos en la figura 2, que muestran las RP de VCB1, VCB3 y VCB6 en diferentes intervalos de tiempo antes de la fecha de AAB+, izquierda: criterios estrictos, derecha: criterios flexibles (clase 0-3 frente a 4, sensibilidad 1, sensibilidad 2). Las curvas de respuesta a dosis se pueden ver con ambos métodos que son los más conspicuos en los análisis con sensibilidad 1 de los criterios estrictos y los criterios flexibles.

Con el fin de comprender el significado de este resultado se va a interpretar en términos del riesgo atribuible a la población (RAP) que estima la proporción de casos de diabetes tipo 1, que podrían evitarse con la vacuna VCB1 en la población. Suponiendo que la RP sea 3,76 (= resultado de criterios estrictos para el intervalo de 6-0 meses antes de la fecha de AAB+) y la prevalencia de la infección por VCB1 sea del 50%, como se indica por la prevalencia de anticuerpos contra VCB1 en el momento de AAB+ en pacientes de referencia, la ecuación de RAP da como resultado el 58% de VCB1 solo (figura 3). La figura 3 muestra el riesgo atribuible a la población (RAP) para VCB1 calculado utilizando una RP de 3,76 y una prevalencia (Pc) del 50% que representa la seroprevalencia en el momento de la seroconversión de autoanticuerpos en los pacientes de referencia.

En el análisis siguiente se combinaron los intervalos de tiempo 6-0 y 12-6. El efecto de riesgo de VCB1 fue significativo también en este análisis de intervalo de tiempo combinado (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB1, intervalo 12-0 frente al intervalo 0. Método con criterios estrictos.

VCB1	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,66	0,434	0,24	1,85
12-0 meses antes de la fecha de AAB+	<b>2,46</b>	<b>0,004</b>	<b>1,33</b>	<b>4,53</b>

Debido a que el efecto de riesgo más fuerte se observó en el intervalo 6-0, se analizó este período utilizando otro tipo de comparación. En lugar de compararlo frente al intervalo 0 (lo que se hizo en los análisis anteriores), este intervalo se comparó con todos los demás intervalos en combinación. Una vez más, los descubrimientos anteriores que muestran la importancia crítica de este intervalo de tiempo estaban apoyados por este análisis (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB1, intervalo 6-0 frente a otros intervalos combinados de tiempo. Método con criterios estrictos.

VCB1	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	3,78	0,001	1,69	8,43

5 Se realizaron análisis similares para los serotipos protectores VCB3 y VCB6. Las tablas 7, 8, 9 y 10 presentan los resultados de diferentes puntos de tiempo para VCB3 y VCB6, respectivamente, cuando se analizaron utilizando criterios flexibles y medios. Los resultados de criterios estrictos y criterios flexibles se presentan en la figura 2 tanto para VCB3 como para VCB6. Se observó protección por VCB3 cuando la infección se produjo al principio. El efecto se debilitó cuando se excluyeron los anticuerpos maternos (criterios medios) lo que sugiere que los anticuerpos maternos pueden proporcionar parte de esta protección.

10 Tabla 7. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB3, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios flexibles.

VCB3	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,37	0,038	0,14	0,95
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,84	0,618	0,43	1,64
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,74	0,439	0,35	1,57
<b>Sensibilidad 1</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,43	0,086	0,16	1,13
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,90	0,754	0,45	1,77
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,64	0,280	0,28	1,44
<b>Sensibilidad 2</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,59	0,291	0,22	1,58
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,87	0,724	0,42	1,84
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,62	0,266	0,27	1,44

Tabla 8. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB6, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios flexibles.

VCB6	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,92	0,772	0,53	1,61
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,53	0,098	0,92	2,52

6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,33	0,264	0,80	2,22
<b>Sensibilidad 1</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,37	0,060	0,13	1,04
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,74	0,410	0,37	1,51
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,04	0,912	0,52	2,08
<b>Sensibilidad 2</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,26	0,227	0,03	2,33
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,57	0,354	0,17	1,88
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,90	0,888	0,20	3,98

Tabla 9. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB3, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios medios.

<b>VCB3</b>	<b>Relación de probabilidades</b>	<b>Valor P</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,50	0,535	0,06	4,47
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,61	0,557	0,11	3,22
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,62	0,327	0,24	1,60
<b>Sensibilidad 1</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,50	0,535	0,06	4,47
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,61	0,557	0,11	3,22
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,42	0,147	0,13	1,36
<b>Sensibilidad 2</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,50	0,535	0,06	4,47
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,39	0,405	0,04	3,59
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,47	0,213	0,14	1,54

5 Tabla 10. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB6, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios medios.

<b>VCB6</b>	<b>Relación de probabilidades</b>	<b>Valor P</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,96	0,902	0,46	1,97
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,87	0,653	0,46	1,62
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,99	0,969	0,63	1,56
<b>Sensibilidad 1</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,70	0,433	0,29	1,69
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,49	0,097	0,21	1,14
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,48	0,222	0,79	2,79
<b>Sensibilidad 2</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,12	0,891	0,22	5,62
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,53	0,358	0,14	2,04
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,34	0,620	0,42	4,27

Los resultados de los criterios estrictos para los mismos virus se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis de regresión logística condicional del desarrollo cronológico de VCB3 y VCB6, otros intervalos frente al intervalo 0. Método con criterios estrictos. \* No hubo infecciones por VCB6 en los casos del intervalo de más de 12 meses según el método con criterios estrictos. Por lo tanto no se pudieron calcular resultados estadísticos para ese intervalo. Sin embargo, en infecciones de referencias se reconocieron también en este intervalo de tiempo lo que apoya el efecto protector de VCB6.

5

<b>VCB3</b>	<b>Relación de probabilidades</b>	<b>Valor P</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>	
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,33	0,326	0,04	2,95
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,13	0,870	0,27	4,74
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,24	0,195	0,03	2,09
<b>VCB6</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	- *	- *	- *	- *
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,56	0,468	0,12	2,70
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,65	0,592	0,13	3,21

En la mayoría de estos análisis para VCB3 y VCB6 se puede ver una tendencia de que en el primero el intervalo de tiempo es el carácter más protector que muestran estos dos virus. Estos resultados como tales son lógicos: El virus protector debe preceder al virus de riesgo, suponiendo que la protección inmunológica cruzada media en el efecto protector. La misma tendencia se observa para ambos virus en la mayoría de los análisis.

10

Como conclusión de los análisis del desarrollo cronológico se puede observar que el momento crítico de la infección por el virus de riesgo VCB1 cae en el intervalo de tiempo de un año y especialmente 6 meses antes de la fecha de

AAB+. Los resultados también apoyan las propiedades protectoras de VCB3 y VCB6.

Si es protector, la falta de dicho virus puede verse como un riesgo para DT1. Por lo tanto la prevalencia inversa y la RP inversa se utilizaron para el cálculo del % de RAP protector utilizando positivo frente a negativo (0-3 frente a 4). El resultado de los cálculos del % de rápidamente protector fue del 57% para VCB3 y 27% para VCB6, como también se muestra en la figura 4.

Orden de las infecciones - desarrollo cronológico

En este análisis se clasificaron en primer lugar diferentes posibilidades del orden de las infecciones en las clases siguientes:

0 = sin riesgo o virus protectores en ningún momento

10 1 = primera infección por el virus de riesgo, VCB1

2 = primera infección por el virus protector, VCB3 o VCB6, uno solo o ambos

3 = la primera infección por el virus de riesgo y protector en el mismo intervalo de tiempo

15 En este primer análisis se analizaron las clases "primer riesgo de infección" (clase 1 anterior) y "clase protectora combinada" (clase 2). Las comparaciones estadísticas se realizaron contra la clase "sin riesgo o virus protectores en ningún momento" (clase 0). Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 12 (criterios estrictos), Tabla 13 (criterios flexibles) y en la Tabla 14 (criterios medios). En estos análisis, se ha tenido en cuenta el período de seguimiento hasta la fecha de AAB+.

Tabla 12. Orden de las infecciones (análisis de regresión logística condicional), en comparación con la clase 0. Método con criterios estrictos.

Orden	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
Primer riesgo	1,29	0,290	0,81	2,06
Primer protector	<b>0,58</b>	<b>0,098</b>	<b>0,31</b>	<b>1,10</b>

20

Tabla 13. Orden de las infecciones (análisis de regresión logística condicional), en comparación con la clase 0. Método con criterios flexibles.

Orden	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Primer riesgo	1,56	0,247	0,73	3,32
Primer protector	0,87	0,727	0,40	1,90

25 Tabla 14. Orden de las infecciones (análisis de regresión logística condicional), en comparación con la clase 0. Método con los criterios medios.

Orden	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Primer riesgo	<b>3,31</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,83</b>	<b>5,99</b>

Primer protector	<b>2,10</b>	<b>0,025</b>	<b>1,10</b>	<b>4,00</b>
------------------	-------------	--------------	-------------	-------------

Estos tres análisis mostraron tendencias que apoyan especialmente la hipótesis de carácter de riesgo de VCB1 pero también la hipótesis de los virus protector. En el segundo tipo de análisis se combinaron las clases 0 y 2 y la clase 1 se analizó frente a esta nueva clase combinada. En este análisis el efecto de riesgo de VCB1 se hace más fuerte (Tabla 15).

- 5 Tabla 15. Primeras infecciones por VCB1 (análisis de regresión logística condicional), en comparación con clases combinadas 0 y 2. Método con criterios estrictos.

Orden	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
Primer riesgo	1,40	0,151	0,88	2,22

Para estudiar el efecto protector más profundamente la clase de riesgo (clase 1) se combinó con la clase 0 y esta clase combinada se comparó con la clase 2. En este análisis el efecto protector se hace más fuerte y el valor P se acerca mucho a la significación estadística (Tabla 16).

- 10 Tabla 16. Primeras infecciones protectoras (análisis de regresión logística condicional), en comparación con las clases combinadas 0 y 1. Método con criterios estrictos.

Orden	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
Primer protector	<b>0,55</b>	<b>0,060</b>	0,29	1,03

En el siguiente análisis los virus protectores VCB3 y VCB6 han sido manipulados como casos independientes y los análisis se realizaron utilizando tanto métodos con criterios estrictos, medios como flexibles (Tablas 17, 18 y 19).

- 15 Tabla 17. Orden de las infecciones (análisis de regresión logística condicional), frente a la clase 0. VCB3 frente a VCB1 y VCB6 frente a VCB1 manipulados como grupos independientes. Método con criterios estrictos.

VCB3 frente a VCB1	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
Primer VCB1	1,25	0,338	0,79	1,95
Primer VCB3	0,41	0,104	0,14	1,20
VCB6 frente a VCB1				
Primer VCB1	1,38	0,170	0,87	2,17
Primer VCB6	0,62	0,236	0,29	1,36

- Tabla 18. Orden de las infecciones (análisis de regresión logística condicional), en comparación con la clase 0. VCB3 frente a VCB1 y VCB6 frente a VCB1 manipulados como grupos independientes. Método con criterios medios.

Clase 0-3 frente al 4	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
VCB3 frente a VCB1				
Primer VCB1	<b>2,76</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,75</b>	<b>4,34</b>
Primer VCB3	1,30	0,706	0,33	5,05



<b>VCB6 frente a VCB1</b>				
Primer VCB1	<b>3,67</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,00</b>	<b>6,72</b>
Primer VCB6	<b>2,48</b>	<b>0,007</b>	<b>1,28</b>	<b>4,80</b>

Tabla 19. Orden de las infecciones (análisis de regresión logística condicional), en comparación con la clase 0. VCB3 frente a VCB1 y VCB6 frente a VCB1 manipulados como grupos independientes. Método con criterios flexibles.

<b>Clase 0-3 frente al 4</b>	<b>Relación de probabilidades</b>	<b>Valor P</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>	
<b>VCB3 frente a VCB1</b>				
Primer VCB1	1,24	0,488	0,68	2,26
Primer VCB3	<b>0,41</b>	<b>0,057</b>	0,16	1,03
<b>VCB6 frente a VCB1</b>				
Primer VCB1	<b>2,37</b>	<b>0,072</b>	0,92	6,06
Primer VCB6	1,85	0,217	0,70	4,91

- 5 Según los análisis de los criterios estrictos las tendencias fueron como era de esperar presentando tendencia de riesgo de VCB1 y las tendencias de protección para VCB3 y VCB6. En el análisis de los criterios medios, una vez más, el carácter de riesgo de VCB1 se evidenció claramente. En los análisis de los criterios flexibles el efecto protector de VCB3 destaca claramente y, en la comparación de VCB6 frente a VCB1 el efecto del riesgo de VCB1 es obvio.
- 10 En conclusión, los estudios de cronología proporcionaron datos de apoyo para el carácter del riesgo de VCB1 y el carácter protector especialmente para VCB3 y en menor medida también para VCB6. Sobre la base de estos resultados se puede concluir que la cronología de estas infecciones influye en el efecto de riesgo de VCB1. El alto riesgo está asociado a la infección por VCB1 sin exposición previa a VCB3 o VCB6. Por otra parte, el efecto de riesgo es atenuado por la exposición previa a VCB3 o VCB6.
- 15 Conclusiones
- Cuando se combinan todos los análisis, se puede concluir que se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los enterovirus y proceso de la enfermedad que conduce a la diabetes tipo 1. Los enterovirus pueden tener un efecto de riesgo (es decir, provocar el proceso de la enfermedad diabética) o un efecto protector. Estos resultados pueden utilizarse en análisis de diagnóstico.
- 20 Los resultados más interesantes están relacionados con los serotipos VCB. En este subgrupo el descubrimiento individual más fuertes fue el carácter de riesgo definido de VCB1. Se identificó en primer lugar en relación con el momento de la seroconversión a la positividad de autoanticuerpos por análisis de seroneutralización que demuestran que las infecciones por VCB1 preceden a la seroconversión inicial de autoanticuerpos. Después de este resultado se confirmó demostrando que las infecciones por VCB1 golpean más a menudo los casos de niños en comparación con los referencias en el intervalo de tiempo que precede inmediatamente a la seroconversión de autoanticuerpos. Por otra parte, fuertes propiedades protectoras se asociaron con serotipos VCB VCB3 y VCB6. También estas asociaciones se identificaron por análisis de seroneutralización en relación con el momento de la seroconversión a positividad de autoanticuerpos. Los estudios del desarrollo cronológico y la cronología apoyaron interacciones específicas entre VCB1, VCB3 y VCB6 donde el efecto diabético de VCB1 está atenuado por la
- 30 exposición previa a VCB3 o VCB6 o ambos.

Análisis de seroneutralización en múltiples momentos, que incluye además VCB2, VCB4 y VCB5

En este análisis también se analizaron los tres serotipos de VCB restantes en un entorno de múltiples momentos como VCB1, VCB3 y VCB6.

Desarrollo cronológico de las infecciones

Para aclarar el posible desarrollo cronológico de las infecciones del subgrupo VCB, se seleccionaron los mismos puntos de tiempo para los análisis de seroneutralización como se describió anteriormente.

Los resultados presentados a continuación se basan en el análisis de seroneutralización de alrededor de 2.000 muestras para cada uno de estos virus VCB. Con el fin de estudiar el desarrollo cronológico de las infecciones causadas por los seis serotipos del VCB las infecciones reconocidas se clasificaron por diferentes intervalos de tiempo con respecto a la fecha de seroconversión a positividad de autoanticuerpos (fecha de AAB+). Los intervalos utilizados se numeraron de 0 a 3 como se describió anteriormente.

Se utilizaron los mismos métodos de criterios flexibles, medios y estrictos descritos anteriormente. Se realizaron análisis estadísticos por regresión logística condicional. Los resultados de los análisis estadísticos de los seis serotipos de VCB se muestran en las Tablas 20-25.

Tabla 20. Análisis de desarrollo cronológico de la infección por VCB1. Método con criterios flexibles con las clases 0-3 frente a 4.

VCB1	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente al 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,89	0,035	1,05	3,40
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	2,27	0,005	1,28	4,03
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	3,54	<0,001	1,95	6,42

Tabla 21. Análisis del desarrollo cronológico de la infección por VCB2. Métodos con criterios flexibles, medios y estrictos con las clases 0-3 frente a 4.

VCB2	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Criterios flexibles</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,79	0,441	0,44	1,43
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,38	0,236	0,81	2,34
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,32	0,001	1,40	3,84
<b>Criterios medios</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,80	0,523	0,41	1,58
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,02	0,946	0,54	1,93
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,29	0,001	1,43	3,66
<b>Criterios estrictos</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,88	0,838	0,26	3,00
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,00	0,994	0,33	3,03
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,44	0,059	0,97	6,15

Tabla 22. Análisis del desarrollo cronológico de la infección por VCB3. Método con criterios flexibles con las clases 0-3 frente a 4.

VCB3	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente al 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,42	0,058	0,18	1,03
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,84	0,609	0,43	1,63
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,69	0,331	0,33	1,45

5 Tabla 23. Análisis del desarrollo cronológico de la infección por VCB4. Métodos con criterios flexibles, medios y estrictos con las clases 0-3 frente a 4.

VCB4	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Criterios flexibles</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,51	0,135	0,21	1,24
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,05	0,887	0,53	2,09
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,07	0,868	0,48	2,41
<b>Criterios medios</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,50	0,380	0,11	2,35
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	- *	- *	- *	- *
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,45	0,363	0,08	2,50
<b>Criterios estrictos</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,00	0,999	0,09	11,04
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	- *	- *	- *	- *
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	0,59	0,685	0,05	7,43

\*Debido a la baja frecuencia general de infecciones por VCB4 no hubo infecciones por VCB4 en los casos en intervalo 12-6 meses según los métodos con criterios medios y estrictos.

Tabla 24. Análisis del desarrollo cronológico de la infección por VCB5. Métodos con criterios flexibles, medios y estrictos con las clases 0-3 frente a 4.

VCB5	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Criterios flexibles</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,56	0,209	0,23	1,38

12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,11	0,755	0,57	2,19
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,60	0,211	0,76	3,37
<b>Criterios medios</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	- *	- *	- *	- *
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,88	0,849	0,23	3,35
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,45	0,488	0,51	4,14
<b>Criterios estrictos</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	-§	-§	-§	-§
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	-§	-§	-§	-§
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	-§	-§	-§	-§

\* No hubo infecciones por VCB5 en los casos de intervalo de más de 12 meses según el método con criterios medios.

§ En el método con criterios estrictos el número de las observaciones disminuyó tan bajo que no se pudieron generar resultados estadísticamente analizados.

- 5 Tabla 25. Análisis del desarrollo cronológico de la infección por VCB6. Método con criterios flexibles con clases 0-3 frente a 4.

VCB6	Relación de probabilidades	Valor P	Intervalo de confianza 95%	
<b>Clase 0-3 frente a 4</b>				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,96	0,874	0,56	1,65
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,54	0,090	0,94	2,54
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,35	0,234	0,82	2,22

**Conclusiones**

Además de VCB1 se encontró también el VCB2 estrechamente relacionado que es un virus de riesgo en análisis en múltiples momentos analiza especialmente en los 6-0 meses antes del intervalo de tiempo AAB+.

- 10 Se calculó también RAP para VCB2 utilizando criterios flexibles RP = 2,26 y la seroprevalencia del 48% en la población de referencia, por lo tanto, se concluye con RAP = 37% (figura 3).

En conjunto, los resultados indican que VCB2 es también un virus de riesgo relacionado con la patogenia de DT1 y por lo tanto útiles en diagnósticos.

**Ejemplo 2. Análisis de heces**

- 15 En total, 4.184 muestras de heces de 359 niños (102 casos y 257 referencias) se han examinado para positividad de enterovirus (EV). En la Tabla 26 todas estas muestras antes mencionadas se han dividido en diferentes categorías. En EV screening PCR ( J. Med. Virol. Nov. 1999; 59(3):378-84. Diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections by RT-PCR and time-resolved fluorometry with lanthanide chelate labeled probes. Lönnrot M., Sjöroos M., Salminen K., Maaronen M., Hyypiä T., Hyöty H.) se identificaron un total de 230 infecciones por separado, de los cuales 166 pudieron serotiparse por secuenciación.
- 20

Tabla 26. Muestras de heces para examen de EV divididas en diferentes categorías.

	Datos totales	Caso	Referencia
Número de grupos	102		
Número de niños	359	102	257
Número de muestras de heces	4184	1321	2863
Número de muestras de heces positivas a enterovirus	307	103	204
Cantidad de infecciones por separado	230	75	155
Número de infecciones serotipadas satisfactoriamente	166 (72%)	54 (72%)	112 (72%)
Número de infecciones sin tipificar	64 (28%)	21 (28%)	43 (28%)
Número de serotipos diferentes	28	17	24

5 La duración de las infecciones y la proporción de infecciones y muestras en las clases de edad se presentan en las figuras 5 y 6, respectivamente, de la forma siguiente: La duración de la excreción de virus se muestra en la figura 5 como porcentaje del número de muestras en serie positivas para la misma cepa de virus. La proporción de infecciones y muestras en las clases de edad (bandas de seis meses) hasta dos años de edad se muestra en la figura 6. La relación se calcula como número de infecciones en clase de edad /número de todas las muestras en la clase de edad.

10 Los criterios estrictamente definidos se establecen para los los casos y niños de referencia, según lo cual, por ejemplo, se definió la diferencia en el día del nacimiento entre el niño del caso y el niño de referencia para que fuera como máximo de  $\pm 2$  meses. En la práctica, en seis grupos de caso/referencia la diferencia de unos niños de referencia estaba fuera de los criterios definidos. Sin embargo, de estos en 5 casos la diferencia fue de sólo 64, 64, 65, 69 y 80 días haciendo la desviación muy pequeña. Sólo en el caso de un grupo caso/referencia la desviación para un niño de referencia la diferencia era notable siendo de 271 días. Además, dos niños de referencia se  
15 volvieron diabéticos tipo 1 durante el periodo de seguimiento.

Serotipia de los enterovirus detectados en muestras de heces en toda la cohorte

20 De todas las muestras de heces positivas a enterovirus (307) se ha sido identificado el serotipo por VP1/VP2 (*J. Clin. Microbiol.* Agosto 2006; 44(8):2698-704 .Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. Nasri D., Bouzlama L., Omar S., Saoudin H., Bourlet T., Aouni M., Pozzetto B., Pillet S. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol.* Agosto de 2007; 45 (8): 2370-9) secuenciación de 166 infecciones (infección = mismo serotipo en una o en dos o más muestras consecutivas). La figura 7 muestra las proporciones de todos los serotipos identificados presentados como una relación de infecciones y muestras recogidas. En el recuadro superior, la relación de todas las infecciones y las muestras se calcula como número de infecciones/número de muestras, y en el recuadro inferior  
25 la relación de las infecciones y las muestras antes de la aparición de los autoanticuerpos AAB se calcula como número de infecciones antes de AAB/número de muestras antes de AAB. La relación de los diferentes serotipos por muestras recogidas se calcula en primer lugar para cada niño del caso y cada niño de referencia, aquí presentado como valor medio de todos los casos y todos las referencias.

30 Según los datos anteriores, pueden verse tres tipos de serotipos. Un grupo incluye los serotipos que son más frecuentes en los niños del caso que en los de referencia, otro grupo comprende los serotipos que son más frecuentes en los niños de referencia que en los del caso, y aún otro grupo a los que son aproximadamente igual de frecuentes en los casos y referencias. En base a esto los autores formaron los siguientes grupos de riesgo de los virus: los serotipos VCA4, VCA5, VCA6, VCA16 y ECHO 18 se seleccionaron para formar el grupo diabetógeno 1; y los serotipos VCA4, VCA5, VCA6, VCB2 y ECHO18 como grupo diabetógeno 2. Cuando la frecuencia de las  
35 infecciones por los serotipos del grupo de riesgo se analizó como un grupo se observó un efecto de riesgo estadísticamente significativo (Tabla 27). Estos análisis abordaron la cuestión de si una o más infecciones por cualquiera de los serotipos de grupos de riesgo (frente a los que no tienen ninguno de estos serotipos de grupo de riesgo) tiene un efecto estadísticamente significativo.

Se obtuvo alta RP al comparar hombres y mujeres por separado. Antes de la aparición de autoanticuerpos, las

5 mujeres tenían la RP más alta (RP = 6,48, P = 0,008). Por el contrario, los hombres tuvieron la RP mayor en el intervalo de 12 meses antes de la seroconversión a positividad de autoanticuerpos (RP = 8,49, P = 0,008) (dos grupos de riesgo combinados). La RP mayor se obtuvo un año antes de AAB en los niños que tenían el genotipo HLA de riesgo (RP = 9,86, P = 0,004) (dos grupos de riesgo combinados). La misma tendencia se observó también en casos de diabéticos y sus referencias; las RP mayores se obtuvieron en un período desde el nacimiento hasta la seroconversión de autoanticuerpos y un año antes de la seroconversión de autoanticuerpos (Tabla 28).

Tabla 27. Análisis estadístico de diferentes grupos de serotipos; dos grupos de riesgo, y dos grupos de riesgo combinados.

Caso	Relación de probabilidades	P>   z	límite inferior 95%	límite superior 95%
<b>Grupo de riesgo 1</b>				
<b>Toda la cohorte</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCA16, ECHO18	1,92	0,030	1,06	3,47
<b>Toda la cohorte antes de AAB</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCA16, ECHO18	2,69	0,005	1,34	5,39
<b>Toda la cohorte un año antes de AAB</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCA16, ECHO18	3,72	0,011	1,35	10,21
<b>Grupo de riesgo 2</b>				
<b>Toda la cohorte</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCB2, ECHO18	2,39	0,008	1,25	4,57
<b>Toda la cohorte antes de AAB</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCB2, ECHO18	3,16	0,003	1,46	6,84
<b>Toda la cohorte un año antes de AAB</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCB2, ECHO18	6,53	0,001	2,07	20,60
<b>Grupos de riesgo 1 y 2 combinados</b>				
<b>Toda la cohorte</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCA16, VCB2, ECHO18	1,92	0,03	1,06	3,47
<b>Toda la cohorte antes de AAB</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCA16, VCB2, ECHO18	2,91	0,003	1,45	5,84
<b>Toda la cohorte un año antes de AAB</b>				
VCA4, VCA5, VCA6, VCA16, VCB2, ECHO18	7,30	0,001	2,32	22,89

Tabla 28. Análisis estadístico de diferentes grupos de serotipos; dos grupos de riesgo. Sólo los casos, que tienen DT1 y sus referencias.

**SOLO CASOS DE DIABETES TIPO 1 (DT1) Y**

<b>SUS REFERENCIAS</b>		<b>102 casos</b>		<b>63 casos de DT1*</b>	
<b>Caso</b>	<b>Relación de probabilidades</b>	<b>P&gt;  z  </b>	<b>límite inferior del 95%</b>	<b>límite superior 95%</b>	
<b>Grupo de riesgo 1</b>					
<b>Toda la cohorte</b>					
VCA4 VCA5, VCA6, VCA16, ECHO18	<b>2,31</b>	<b>0,028</b>	<b>1,09</b>	<b>4,85</b>	
<b>Toda la cohorte antes de AAB</b>					
VCA4 VCA5, VCA6, VCA16, ECHO18	<b>4,49</b>	<b>0,003</b>	<b>1,67</b>	<b>12,07</b>	
<b>Toda la cohorte un año antes de AAB</b>					
VCA4 VCA5, VCA6, VCA16, ECHO18	<b>3,99</b>	<b>0,029</b>	<b>1,14</b>	<b>13,87</b>	
<b>Grupo de riesgo 2</b>					
<b>Toda la cohorte</b>					
VCA4 VCA5, VCA6, VCB2, ECHO18	<b>2,91</b>	<b>0,014</b>	<b>1,24</b>	<b>6,84</b>	
<b>Toda la cohorte antes de AAB</b>					
VCA4 VCA5, VCA6, VCB2, ECHO18	<b>5,58</b>	<b>0,004</b>	<b>1,73</b>	<b>18,05</b>	
<b>Toda la cohorte un año antes de AAB</b>					
VCA4 VCA5, VCA6, VCB2, ECHO18	<b>5,04</b>	<b>0,02</b>	<b>1,28</b>	<b>19,78</b>	

5 \* Sólo los casos que progresaron a diabetes tipo 1 durante la observación clínica prospectiva, y sus referencias

El número de niños e infecciones identificadas en los grupos de riesgo 1 y 2 combinados se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Número de niños e infecciones en los grupos de riesgo 1 y 2 combinados.

	Número de niños		Número de infecciones	
	Caso	Referencia	Caso	Referencia
<b>Toda la cohorte</b>	<b>25</b>	<b>39</b>	<b>33</b>	<b>45</b>
<b>Grupos de riesgo 1 y 2 combinados</b>				
<b>Antes de AAB</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>29</b>
<b>Un año antes de AAB</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>13</b>

Parece que en el análisis de las heces se ve el efecto del riesgo de determinados virus Coxsackie A si la infección se padece a edad muy joven y especialmente si el niño tiene el genotipo HLA de riesgo moderado. Además podrían estar asociados a un proceso autoinmunitario agresivo que conduce a daños graves en las células beta y diabetes.

- 5 En conclusión, cuando se combinaron varios serotipos, podría reconocerse un grupo de virus de riesgo. VCA4, VCA5, VCA6, VCA16 y E18 son los más interesantes como virus potenciales de riesgo. A destacar que VCA4, VCA5, VCA6 y VCA16 están genéticamente muy relacionados entre sí. El efecto de riesgo más claro estaba asociado al sexo masculino en el intervalo de tiempo limitado antes de la fecha de seroconversión de autoanticuerpos.
- 10 Compendio de análisis de suero y heces

Se creó el siguiente esquema de puntuación de serotipos que muestra los virus diabetógenos y protectores más prometedores. El tipo de análisis que sugiere diferente carácter y la fuerza del resultado correspondiente también se muestran en la escala (+)/+//++/+++. Todos estos análisis se realizaron en un solo momento que representa la primera muestra positiva de autoanticuerpos.

- 15 Ejemplo 3. Material que muestra el carácter protector de VCB4 y VCB5, y que apoya el carácter protector de VCB3 y el carácter de riesgo de VCB2.

Virus	Propiedad		Tipo de análisis	
	Diabetógeno	Protector	Seroneutralización	Muestras de heces
VCB1	x		+++	
VCB2	x		++	
Echo32	x		++	
Echo29	x		+	
Echo14	x		+	
VCA4	x			+
VCA16	x			+
VCA5	x			+
VCA6	x			(+)
Echo18	x			(+)
Echo3	x		(+)	
<hr/>				
VCB3		x	+++	++
VCB6		x	++	
VCB4		x	++	+



Virus	Propiedad		Tipo de análisis	
	Diabetógeno	Protector	Seroneutralización	Muestras de heces
VCB5	x		++	
Echo11	x		+	+
Echo13	x		(+)	(+)

Análisis de las muestras tomadas a la edad de un año

- En este estudio se recogieron un total de 284 muestras de suero de los niños a la edad de un año (intervalo de 321 - 430 días) y se estudiaron sus respuestas a la seroneutralización con seis serotipos VCB. Cuando se analizaron estadísticamente utilizando el diseño de casos de referencias emparejados, VCB3 y especialmente VCB4 resultaron ser protectores (Tabla 30). Por lo tanto pueden esperarse infecciones a edad temprana para proporcionar protección contra un proceso autoinmunitaria diabetógeno que comienza temprano.

Tabla 30. Análisis de regresión logística condicional de 6 serotipos VCB en las muestras tomadas a la edad de un año. Método con criterios flexibles: clases 0-3 frente a 4.

RP	P	Intervalo de confianza 95%	
<b>VCB1</b>			
1,05	0,857	0,62	1,79
<b>VCB2</b>			
1,04	0,89	0,6	1,79
<b>VCB3</b>			
0,35	0,019	0,15	0,84
<b>VCB4</b>			
0,16	0,001	0,06	0,48
<b>VCB5</b>			
1,2	0,724	0,43	3,34
<b>VCB6</b>			
1,01	0,961	0,57	1,8

Momento del diagnóstico de la diabetes tipo 1

- 10 En total, 215 muestras de suero que se obtuvieron de los niños evolucionaron a diabetes tipo 1 y sus correspondientes referencias, Estas muestras se analizaron realizando análisis de seroneutralización con seis virus VCB. Cuando los análisis estadísticos se realizaron para estos virus con configuración transversal, VCB5 mostró una tendencia para un carácter protector (Tabla 31). Este resultado sugiere que VCB5 tiene un efecto atenuante en el proceso de autoinmunidad de la diabetes tipo 1 una vez que ya ha comenzado este proceso.
- 15 Tabla 31. Análisis de regresión logística condicional de 6 serotipos VCB en muestras tomadas en el momento del diagnóstico de la diabetes tipo 1. Método con criterios flexibles: clases 0-3 frente a 4.

RP	P	Intervalo de conf. 95%	
<b>VCB1</b>			
0,98	0,961	0,56	1,74
<b>VCB2</b>			
1,38	0,311	0,74	2,55
<b>VCB3</b>			
0,68	0,489	0,23	2
<b>VCB4</b>			
0,94	0,917	0,27	3,24
<b>VCB5</b>			
0,34	0,095	0,1	1,2
<b>VCB6</b>			
0,92	0,803	0,48	1,77

Intervalo de muestras entre la fecha de seroconversión de autoanticuerpos y el diagnóstico de diabetes tipo 1

Los resultados de la seroneutralización con fecha de la seroconversión de autoanticuerpos realizados con seis serotipos VCB se compararon con los resultados de las muestras de la fecha del diagnóstico de la diabetes tipo 1 tomadas de los mismos niños y utilizando los mismos virus. En este análisis, el grupo de referencia consistió en niños que fueron negativos para un virus dado en ambas muestras. También en este análisis se detectó una tendencia protectora para VCB5 lo que sugiere atenuación del proceso de autoinmunidad de la diabetes tipo 1 (Tabla 32). Curiosamente, VCB2 presentaba una tendencia de riesgo con una RP alta lo que indica que puede acelerar la evolución del proceso autoinmunitario tras su inicio.

Tabla 32. Análisis de regresión logística condicional de 6 serotipos VCB. Se compararon el intervalo de muestras entre la fecha de la seroconversión de autoanticuerpos y la fecha de diagnóstico de la diabetes tipo 1. Método con criterios flexibles: clases 0-3 frente a 4. Los cambios de negativo a positivo se han analizado contra el grupo de referencia negativo a negativo.

RP	P	Intervalo de conf. 95%	
<b>VCB1</b>			
0,82	0,797	0,18	3,78
<b>VCB2</b>			
6,04	0,106	0,68	53,32
<b>VCB3</b>			
0,78	0,778	0,14	4,36
<b>VCB4</b>			
0,35	0,339	0,04	3,02

<b>VCB5</b>			
0,18	0,108	0,023	1,45
<b>VCB6</b>			
0,89	0,813	0,35	2,27

#### Conclusión

El análisis de las muestras tomadas en la edad de un año demostró que las infecciones por VCB3 y VCB4 protegen a los niños de la diabetes tipo 1. Los resultados sugieren que las primeras infecciones que se producen por VCB3 y VCB4 pueden dar una protección frente al proceso autoinmunitaria diabetógeno que empieza a temprana edad. Además, una tendencia protectora también podría estar asociada a VCB5 cuando se analizaron las muestras tomadas en la fecha de diagnóstico de la diabetes tipo 1 y cuando se compararon el intervalo de tiempo entre la seroconversión de autoanticuerpos y la fecha de diagnóstico de la diabetes tipo 1. Estos resultados sugieren que el mecanismo de la protección para las infecciones con VCB4 puede ser la atenuación del proceso autoinmunitario 1 en curso. Además, se detectó la relación entre las infecciones con VCB2 y el riesgo de diabetes tipo 1 cuando se compararon los datos de intervalo entre muestras con fecha de seroconversión de autoanticuerpos y las muestras tomadas en la fecha de diagnóstico de la diabetes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un análisis de diagnóstico para evaluar el riesgo de diabetes tipo 1 (DT1) que comprende determinar la presencia de al menos un riesgo o al menos un serotipo de enterovirus protector en una muestra corporal, por lo que la presencia de al menos un serotipo de riesgo seleccionado del grupo que consiste en VCB1, VCB2, Echo3, Echo14, Echo18, Echo29, Echo32, VCA4, VCA5, VCA6 y VCA16 indica un mayor riesgo de contraer DT1, o la presencia de al menos un serotipo protector seleccionado del grupo que consiste en VCB3, VCB4, VCB5, VCB6, Echo11 y Echo13 indica un menor riesgo de contraer DT1.
2. El análisis de diagnóstico de la reivindicación 1, que comprende determinar la presencia de al menos uno de VCB1, VCB2, VCB3, VCB4, VCB5 y VCB6.
- 10 3. El análisis de diagnóstico de la reivindicación 1, que comprende determinar la presencia de al menos uno de VCB1 y VCB2.
4. El análisis de diagnóstico de la reivindicación 1, que comprende determinar la presencia de al menos un serotipo de riesgo, y al menos un serotipo protector.
5. El análisis de diagnóstico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en donde la presencia del enterovirus se determina detectando un componente del virus o una respuesta inmunitaria al mismo en la muestra corporal.
- 15 6. El análisis de diagnóstico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en donde la presencia del virus se determina por PCR, RT-PCR, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, detección de antígenos usando EIA u otros métodos, aislamiento del virus, secuenciación, microscopía electrónica, o microscopía inmunoelectrónica.
7. El análisis de diagnóstico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en donde la presencia del virus se determina por detección de una respuesta inmunitaria contra el virus midiendo la respuesta de anticuerpos específicos del virus, o midiendo una respuesta inmunitaria al virus mediada por células, o mediciones de la activación del sistema inmunitario innato.
- 20 8. Un método para el seguimiento de la eficacia de los tratamientos antivíricos destinado a la prevención de la DT1, que comprende proporcionar una muestra de un paciente que ha recibido tratamiento antivírico, y determinar la presencia de al menos un riesgo o al menos un serotipo enterovirus protector en la muestra, con lo que la presencia de al menos un serotipo de riesgo seleccionado del grupo que consiste en VCB1, VCB2, Echo3, Echo14, Echo18, Echo29, Echo32, VCA4, VCA5, VCA6, y VCA16, indica que el tratamiento no ha reducido el riesgo de contraer DT1, o la presencia de al menos un serotipo protector seleccionado del grupo que consiste en VCB3, VCB4, VCB5, VCB6, Echo11, y Echo13, indica que el tratamiento ha reducido el riesgo de contraer DT1.
- 25 9. El método de la reivindicación 8, que comprende determinar la presencia de al menos uno de VCB1, VCB2, VCB3, VCB4, VCB5 y VCB6.
10. El método de la reivindicación 8, que comprende determinar la presencia de al menos uno de VCB1 y VCB2.
11. El método de la reivindicación 8, que comprende determinar la presencia de al menos un serotipo de riesgo y al menos un serotipo protector.
- 35 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, en donde la presencia del enterovirus se determina detectando un componente del virus o una respuesta inmunitaria a éste en la muestra corporal.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, en donde la presencia del virus se determina por PCR, RT-PCR, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, detección de antígenos empleando EIA u otros métodos, aislamiento del virus, secuenciación, microscopía electrónica o microscopía inmunoelectrónica.
- 40 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, en donde la presencia del virus se determina detectando una respuesta inmunitaria contra el virus midiendo la respuesta de anticuerpos específicos del virus, o midiendo la una respuesta inmunitaria al virus mediada por células, o mediciones de activación del sistema inmunitario innato.
- 45 15. Utilización *in vitro* uso de un equipo de diagnóstico para evaluar el riesgo de DT1 o en el seguimiento de la eficacia de los tratamientos antivíricos destinados a la prevención de DT1, en donde el equipo comprende medios para determinar la presencia de al menos un riesgo y al menos un serotipo enterovirus protector en un muestra corporal, por lo que el serotipo de riesgo se selecciona entre el grupo que consiste en VCB1, VCB2, Echo3, Echo14, Echo18, Echo29, Echo32, CAV4, CAV5, CAV6, y CAV16, y el serotipo de protección se selecciona del grupo que consiste en VCB3, VCB4, VCB5, VCB6, Echo11, y Echo13.
- 50

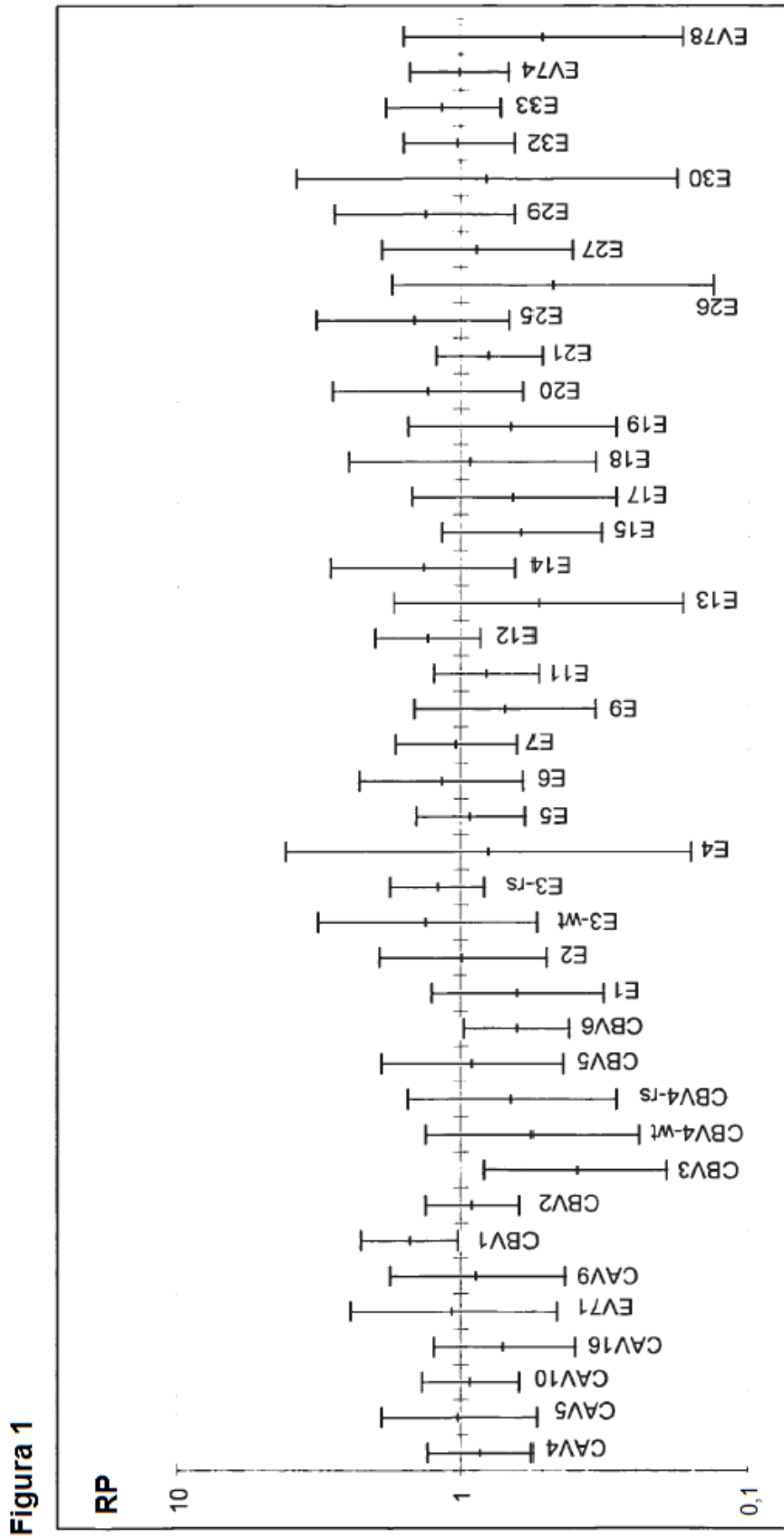


Figura 1

Figura 2

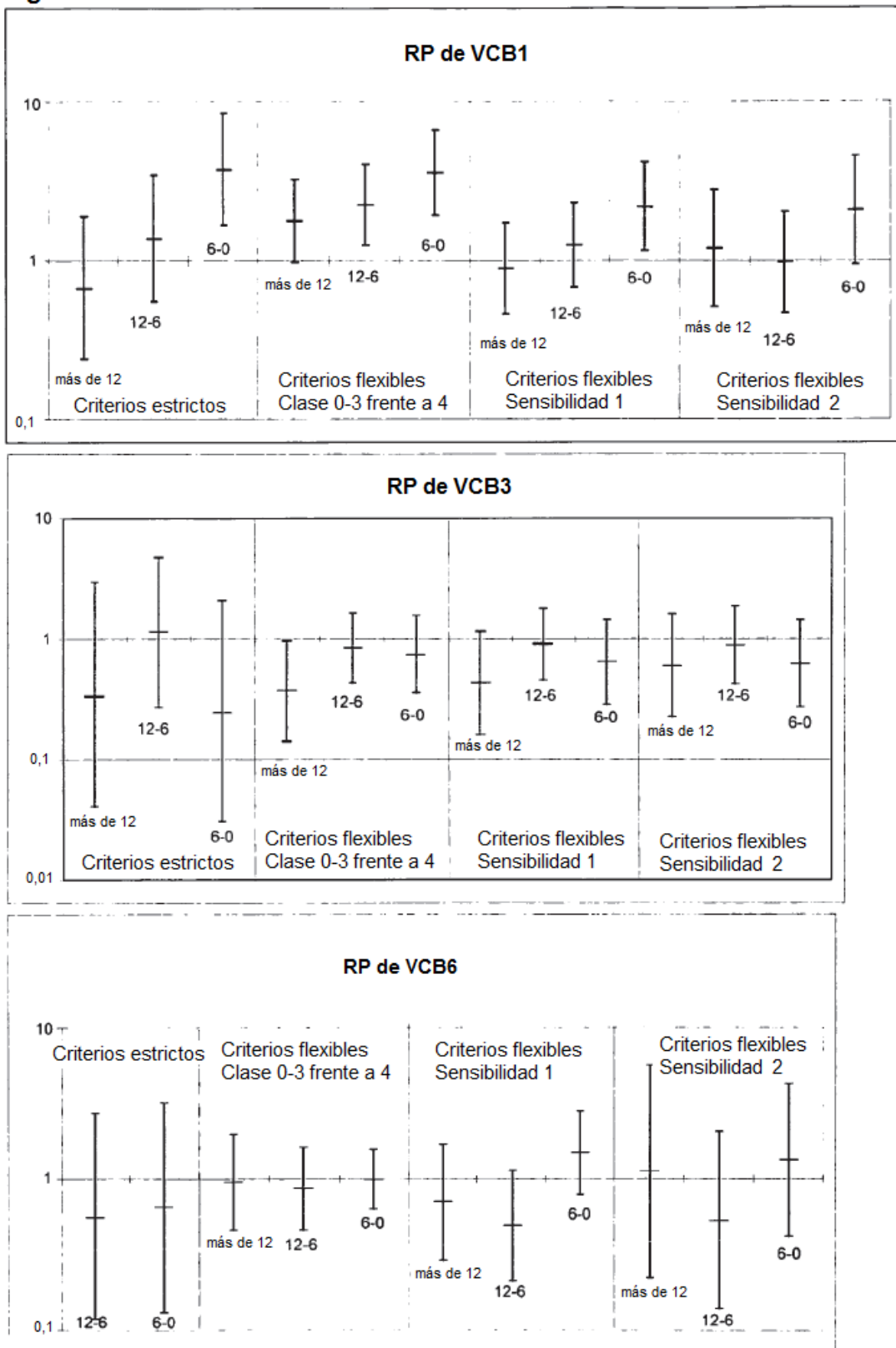


Figura 3

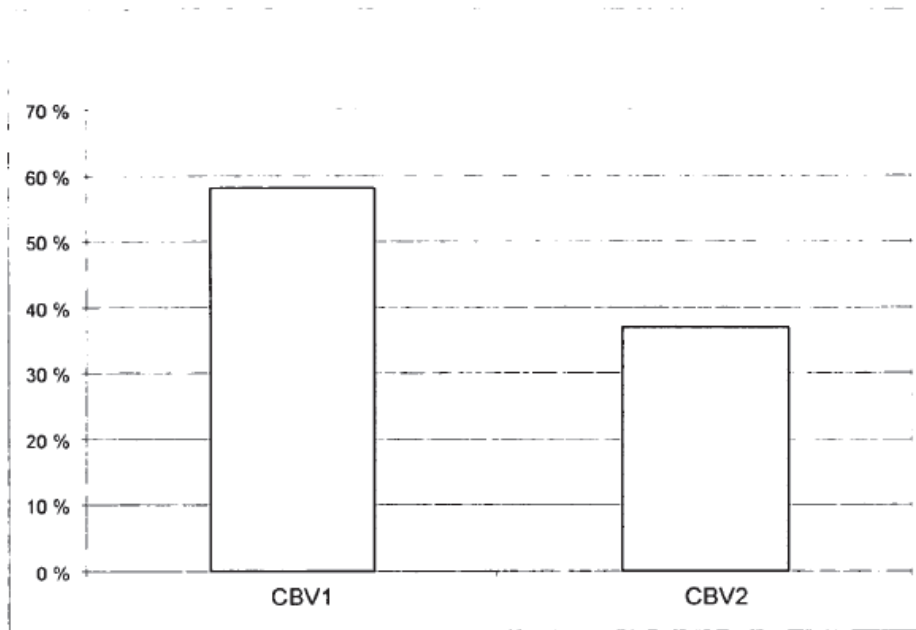


Figura 4

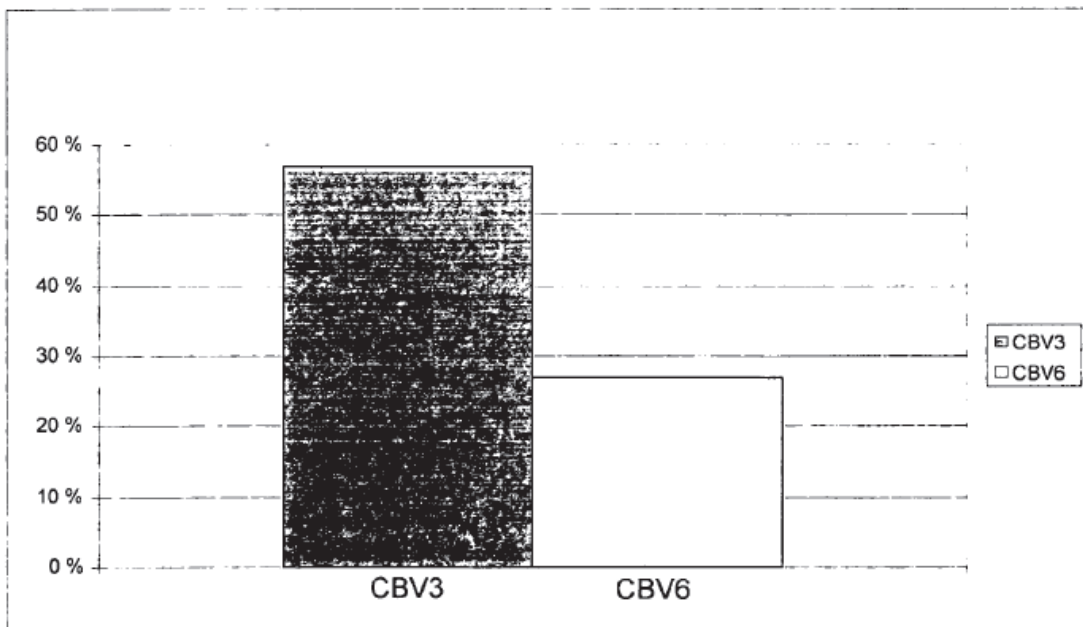


Figura 5

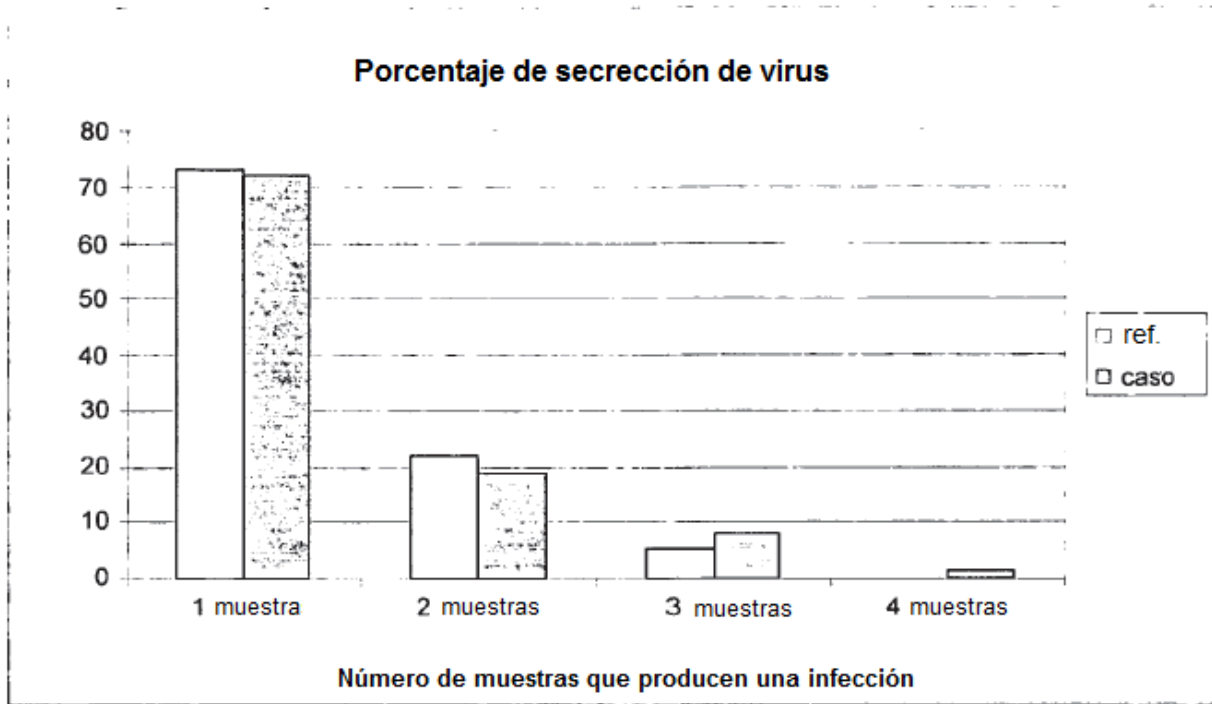


Figura 6

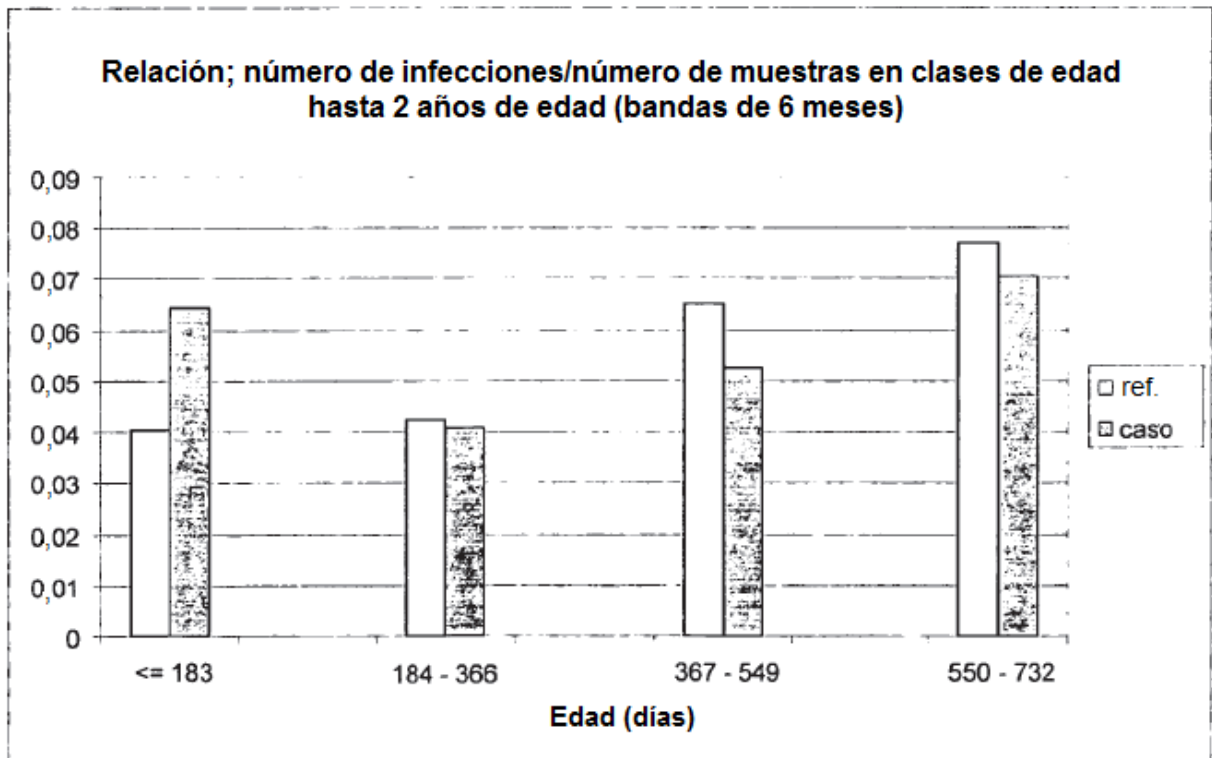




Figura 7

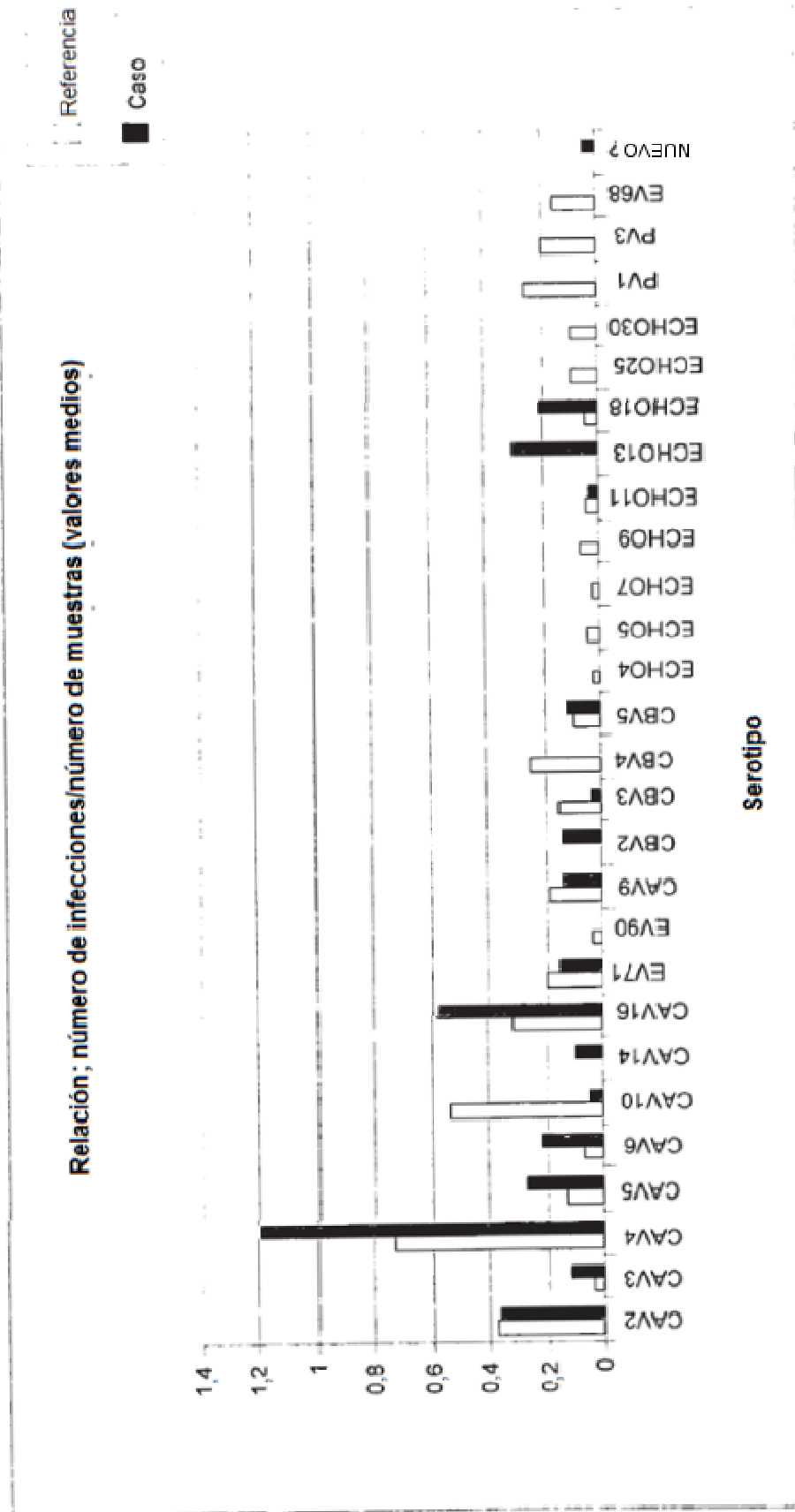


Figura 7 (continuación)

