

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 200**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2008 PCT/EP2008/009113**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09056283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008 E 08844542 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2210097**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico in vitro y/o monitorización de terapia in vitro de infecciones**

30 Prioridad:  
**29.10.2007 DE 102007052518**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.10.2017**

73 Titular/es:  
**AUTOIMMUN DIAGNOSTIKA GMBH (100.0%)  
EBINGER STRASSE 4  
72479 STRASSBERG, DE**

72 Inventor/es:  
**SCHÖLLHORN, VOLKMAR**

74 Agente/Representante:  
**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 637 200 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 para el diagnóstico in vitro y/o monitorización de terapia in vitro de infecciones

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico in vitro y/o monitorización de terapia in vitro de infecciones y/o enfermedades infecciosas, especialmente para distinguir entre infecciones agudas por un lado e infecciones latentes o superadas por otro, así como un kit correspondiente.
- 10 [0002] Para identificar estructuras propias del cuerpo y para la defensa ante organismos o sustancias ajenos al cuerpo, los organismos superiores, como los animales o las personas, disponen de un sistema inmunológico altamente complejo. El sistema inmunológico humano se puede subdividir en dos grupos de mecanismos de defensa. Se distingue entre inmunidad humoral y celular. La defensa inmune innata se denomina inmunidad natural. En caso de que la inmunidad se cree únicamente después de entrar en contacto con estructuras reconocidas como ajenas al cuerpo, llamadas antígenos, se denomina inmunidad adquirida. Para dichos mecanismos muy específicos, los leucocitos, tanto monocitos como granulocitos y linfocitos B y T, desempeñan un papel fundamental tanto en la defensa celular como humoral.
- 15 [0003] En caso de infección o enfermedad infecciosa, el organismo es capaz de reaccionar ante múltiples antígenos. Con una proliferación de los linfocitos B, particularmente con una expansión clonal, en combinación con una selección de otras células de defensa incluyendo procedimientos de diferenciación, por lo general, el organismo puede combatir los antígenos intrusos con anticuerpos neutralizantes.
- 20 [0004] En la práctica, el médico plantea un diagnóstico; sin embargo, frecuentemente el problema es distinguir entre infecciones o enfermedades infecciosas agudas, latentes o superadas o enfermedades. La distinción entre infecciones que se acaban de producir (agudas o activas) e infecciones latentes o crónicas o ya superadas es decisiva, por ejemplo, para estimar si los pacientes infectados o enfermos todavía son contagiosos.
- 25 [0005] Para distinguir las distintas fases de las infecciones o enfermedades infecciosas se ofrece una prueba directa de agentes infecciosos o parte de ellos. No obstante, por un lado es muy complicado aislar los agentes infecciosos. Por otro, deben cultivarse agentes infecciosos aislados con la ayuda de prácticas de cultivo apropiadas para que se pueda realizar una prueba correcta. Esto normalmente conlleva un alto coste y un largo periodo de tiempo y además, no es factible para todos los agentes patógenos.
- 30 [0006] En una forma indirecta de la prueba de infección también entran en consideración los anticuerpos, que se forman contra el agente infeccioso. No obstante, una desventaja en este caso es que los anticuerpos, habitualmente, se pueden identificar en la sangre de los pacientes años después de superar la infección. Por lo tanto, en este caso en particular tampoco se puede diferenciar entre infección aguda, latente o infección superada. Sin embargo, por esta misma razón, sería deseable la adopción de medidas terapéuticas sucesivas cuando se hace una declaración a modo de diagnóstico sobre el estado de la infección (agudo, latente o superado).
- 35 [0007] Se conocen los procedimientos de detección de la infección respiratoria provocada por el coronavirus en pollos (Pei J. et al.: Specific antibody secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory coronavirus", Developmental & Comparative Immunology 29,2005: 153-160).
- 40 [0008] Del documento US 2005/0089942 A1 se conocen procedimientos de detección de enfermedades infecciosas, en particular, también para la tuberculosis.
- 45 [0009] Además, se conoce la prueba de células B, que produce anticuerpos dirigidos contra el virus de hepatitis B (Böcher et al.: "Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection, Clin Exp Immunol. 1996, 105: 52-58).
- 50 [0010] Asimismo, se divulgó la activación de células B en la mucosa del duodeno tras una vacuna oral contra el cólera (Nilssen et al.: "B-cell Activation in Duodenal Mucosa after Oral Cholera Vaccination in IgA Deficient Subjects with or without IgG Subclass Deficiency", Scand J. Immunol. 38, 1993: 201-208).
- 55 [0011] Además, se divulgó la prueba de de células secretoras de anticuerpos específicos con el método ELISPOT (Czerkinsky et al.: "A Solid-Phase Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assay for Enumeration of Specific Antibody-Secreting Cells, Journal of Immunological Methods, 65, 1983: 109-121).
- 60 [0012] La presente invención tiene como objetivo crear un procedimiento fiable para el diagnóstico in vitro y/o monitorización de terapia in vitro, que permita sobre todo realizar una distinción con respecto al estado de la infección.
- 65

[0013] Este objetivo se consigue, según la invención, a través de un procedimiento con las características de la reivindicación independiente 1. Las formas de realización preferidas del procedimiento son objeto de las reivindicaciones dependientes de la 2 hasta la 9. Además, la presente invención también hace referencia a las aplicaciones del procedimiento según las reivindicaciones 10 y 11. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un kit con las características de la reivindicación 12.

[0014] El procedimiento, según la invención, es un procedimiento para el diagnóstico in vitro y/o motorización de terapia in vitro de infecciones y/o enfermedades infecciosas para la distinción entre infecciones o enfermedades infecciosas agudas por un lado e infecciones o enfermedades infecciosas latentes o superadas por otro, donde las células eucariotas se incuban con un antígeno, preferiblemente sobre una superficie de análisis o un soporte, y se prueban en cuanto a células secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno (ASC), cuyos anticuerpos secretados están dirigidos específicamente contra el antígeno.

[0015] En otras palabras, se trata de un procedimiento, según la invención, de diagnóstico in vitro y/o monitorización de terapia in vitro de infecciones y/o enfermedades infecciosas para la distinción entre infecciones o enfermedades infecciosas agudas por un lado e infecciones o enfermedades infecciosas latentes o superadas por otro, donde las células eucariotas, se incuban con un antígeno, preferiblemente sobre una superficie de análisis o un soporte y se prueban en cuanto a células secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno (ASC), cuyos anticuerpos secretados están dirigidos específicamente contra el antígeno.

[0016] A través de la invención se crea un procedimiento in vitro que permite la distinción entre infecciones agudas (activas) por un lado e infecciones latentes o superadas (crónicas) por otro. En el marco del procedimiento según la invención se investiga en células eucariotas la presencia de ASC, cuyos anticuerpos segregados se dirigen contra el antígeno, que se usa para la incubación de las células eucariotas. Las ASC que se pueden probar gracias al procedimiento según la invención, son por regla general células efectoras, particularmente de células B efectoras. Este tipo de células particular permite realizar una diferenciación entre infecciones agudas (activas) por un lado e infecciones latentes o superadas (crónicas) por otro. Si el resultado de la prueba de células eucariotas sobre ASC es positivo, las células eucariotas provendrán de un organismo humano o animal que padece una infección aguda del antígeno afectado o en su caso también una enfermedad infecciosa. Si por el contrario no se identifica ningún ASC, las células eucariotas evaluadas provendrán por regla general de organismos humanos o animales que padezcan o bien una infección latente del antígeno afectado, particularmente una infección persistente durante meses, o que estén sanos desde el punto de vista médico. Bajo organismo humano o animal sano se entiende un organismo que o bien ha superado una infección o bien no ha padecido una infección en ningún momento.

[0017] Las células eucariotas provienen usualmente de una prueba humana y/o animal. Las células eucariotas provienen preferiblemente de muestras de líquidos corporales, en particular de pruebas de sangre, frotis del cuello uterino y/o lavados bronquiales.

[0018] En una forma de realización preferida, las células eucariotas, particularmente las que se presentan entre las células eucariotas como células inmunocompetentes, denominadas células del sistema inmunitario, se enriquecen antes de la incubación. En el caso de las células eucariotas se trata preferiblemente de células sanguíneas, particularmente de linfocitos B, linfocitos T, granulocitos, células dendríticas, macrófagos y/o eritrocitos. Para el enriquecimiento de las células eucariotas se tienen en consideración las técnicas de enriquecimiento celular habitualmente utilizadas. De esta forma, se pueden enriquecer las células eucariotas, por ejemplo, a través de la centrifugación, particularmente de la centrifugación por gradiente. En la centrifugación por gradiente pueden, por ejemplo, utilizarse los gradientes de azúcar. Preferiblemente, las células eucariotas se liberan antes de la incubación de eritrocitos. En una forma de realización posible, se enriquecen las ASC que se presentan entre las células eucariotas.

[0019] En una forma de realización particularmente preferida se liberan las células eucariotas antes de la incubación de suero sanguíneo, particularmente suero sanguíneo autólogo. Esto ocurre usualmente partiendo de un análisis de sangre coagulada mediante la separación del porcentaje sanguíneo líquido de componentes sanguíneos celulares. En lo que respecta a los componentes celulares y a las técnicas adecuadas de separación se hace referencia al párrafo anterior. Con la separación del suero sanguíneo se eliminan con una ventaja especial componentes de suero molestos, especialmente proteínas de suero, como, por ejemplo, albúmina y/o inmunoglobulina, especialmente anticuerpos. En caso contrario, estos podrían conducir a resultados de prueba erróneos.

[0020] En una forma de realización adicional se utilizan como antígeno los fragmentos de los tipos de agente patógeno, particularmente epitopes patógenos. En el caso de los epitopes se trata particularmente de péptidos, preferiblemente oligopéptidos. Los epitopes adecuados pueden estar formados por entre 5 hasta 25, especialmente entre 9 y 11 unidades de aminoácidos.

[0021] Está previsto según la invención, en particular, que para la incubación de células eucariotas se utilice al menos un antígeno del grupo PPD, RD 1, RD 2, ESAT 6, CFP 10, MPT 41, MTB 64, PPE 44, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D, OSP E, VIsE, p 58, p 100 y Dbp A.

5 [0022] Para la incubación de las células eucariotas se utiliza al menos un antígeno específico de tuberculosis, particularmente del grupo PPD, RD 1, RD 2, MPT 64, MTB 41 y PPE 44.

[0023] Para la incubación de las células eucariotas se utiliza alternativamente o en combinación al menos un antígeno específico de borreliosis, particularmente del grupo VIsE, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D y OSP E.

10 [0024] El procedimiento según la invención se realiza usualmente en una superficie de análisis idónea, particularmente en un recipiente de análisis o en un soporte idóneo. La superficie de análisis o el soporte pueden ser, por ejemplo, fondos de cavidades o los agujeros de placas perforadas, planchas onduladas o placas de microtítulo. Tales placas perforadas o de microtítulo, que preferiblemente se utilizan como recipientes de análisis, son comercializadas, en particular con distinto número de cavidades o agujeros (Wells). Por ejemplo, el procedimiento según la invención se puede realizar con ayuda de una placa de microtítulo 96. Las placas de microtítulo pueden presentar, por ejemplo, un diámetro de cavidad de aprox. 5 mm, lo que se corresponde con una superficie de aproximadamente 20 mm<sup>2</sup>. La superficie de análisis utilizada es, convenientemente, plana. De esta forma se pueden evitar las diferencias de concentración local en el procedimiento según la invención. Además, las superficies de análisis planas son sustancialmente mejores para la producción de estratos celulares simples (monocapa). Los materiales típicos de los que están compuestos los recipientes de análisis adecuados son, por ejemplo, el poliestireno, el polifluoruro de vinilideno (PVDF), la nitrocelulosa o el nylon.

20 [0025] En una forma de realización especialmente adecuada, se calcula el número de células específicas secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno. El método de medición se explica en la siguiente descripción.

[0026] Conforme a lo anteriormente mencionado, según la invención, preferiblemente, se calcula el número de células secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno.

30 [0027] En una forma de realización particularmente preferida, el procedimiento se realizará mediante el método ELISPOT (Enzyme Linked Immuno Spot Technique). En otras palabras, según la invención, es preferible que el proceso se realice mediante el método ELISPOT. El método ELISPOT, en contraposición a la técnica Elisa, se realiza en una fase fija, generalmente sobre un soporte idóneo. El soporte puede ser la placa perforada o placa de microtítulo mencionadas anteriormente o sus fondos de cavidad o agujeros. Con la ayuda del método ELISPOT puede medirse en general la segregación (secreción o expulsión) de citocinas y/o anticuerpos de células bajo la aplicación de antígenos o anticuerpos, que unen específicamente estas citocinas o anticuerpos. Las citocinas o anticuerpos secretados son usualmente visibles sobre fondos de cavidad de placas de microtítulo en forma de puntos coloridos, llamados spots. Se pueden hacer declaraciones sobre la actividad de las células a través del recuento de spots y/o por determinación de su intensidad de color mediante programas de software apropiados.

[0028] El método ELISPOT aplicable dentro del marco de la invención comprende en una forma de realización adicional los siguientes pasos:

- 45
- a) aplicación de moléculas de captura sobre una superficie de análisis o sobre un soporte,
  - b) incubación de las células eucariotas con el antígeno sobre la superficie de análisis o sobre el soporte,
  - c) adición de moléculas de detección sobre la superficie de análisis o sobre el soporte,
  - d) detección de ASC sobre la superficie de análisis o sobre el soporte, cuyos anticuerpos segregados están dirigidos específicamente contra el antígeno.

50 [0029] Las moléculas de captura aplicadas pueden estar ligadas generalmente a la superficie de análisis y se fijan a esta de manera particularmente ventajosa. Las moléculas de captura pueden aplicarse particularmente de manera estratiforme sobre la superficie de análisis. Como moléculas de captura, es preferible utilizar anticuerpos (anticuerpos de captura), que están dirigidos contra anticuerpos o subtipos de anticuerpos de las ASC por identificar. Por ejemplo, en los subtipos de anticuerpos, en el caso del PPD como antígeno, se puede tratar de al menos uno de los siguientes subtipos del grupo IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. En este contexto, también se habla de los denominados anticuerpos. En el caso de las moléculas de captura se puede tratar de anticuerpos policlonales o monoclonales, donde son preferibles los anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, para la aplicación de las moléculas de captura sobre la superficie de análisis, se utiliza una dispersión acuosa de moléculas de captura. Para la fabricación de la dispersión acuosa se pueden dispersar las moléculas de captura en un tampón idóneo, por ejemplo, en un tampón de acetato. Si fuese necesario, la dispersión podría filtrarse para obtener una solución. La dispersión acuosa se fabrica generalmente justo antes de la aplicación de las moléculas de captura sobre la superficie de análisis. Preferiblemente, las moléculas de captura presentan una concentración de entre 1 y 3 µg/ml<sup>3</sup>, particularmente aprox. de 2,5 µg/ml<sup>3</sup> en la dispersión acuosa.

65

- 5 [0030] Las células eucariotas se aplican normalmente en forma de suspensión celular sobre la superficie de análisis. El antígeno se aplica normalmente como solución acuosa sobre la superficie de análisis. Según la invención, está previsto particularmente que el antígeno se aplique sobre la superficie de análisis antes que las células eucariotas. El antígeno se fija habitualmente sobre la superficie de análisis, en particular acoplado directamente en el fondo de la superficie de análisis. En este caso no se debe añadir ningún antígeno adicional para incubar las células eucariotas. La incubación de las células eucariotas se llevará a cabo durante un periodo de entre 2 y 18 horas, particularmente de entre 2 y 4 horas. De esta forma se consigue de manera especialmente ventajosa que ninguna célula de memoria se desarrolle contra el antígeno, ya que en caso contrario, esto conduciría a una falsificación de los resultados de la prueba. Por consiguiente, se garantiza que sólo se detectan las células que son responsables de una infección aguda o activa. A través de la incubación con el antígeno, se provoca que las ASC presentes entre las células eucariotas, cuyos anticuerpos están dirigidos específicamente contra el antígeno, provoquen la segregación de los anticuerpos correspondientes. Estos son interceptados a través de las moléculas de captura y de esta forma son ligados a la superficie de análisis.
- 15 [0031] Además, se pueden prever según la invención pasos de lavado. La superficie de análisis se puede lavar, por ejemplo, antes de la adición de las moléculas de detección. Para lavar la superficie de análisis se utilizan habitualmente soluciones tampón, por ejemplo, el tampón fosfato. Así se eliminan componentes independientes de la superficie de análisis, en particular, células eucariotas. En caso necesario se puede repetir el lavado de la superficie de análisis, eventualmente incluso varias veces.
- 20 [0032] Además de las moléculas de detección, normalmente se utiliza otro tipo de anticuerpos, los denominados anticuerpos de detección. Las moléculas de detección están específicamente dirigidas contra los anticuerpos de las ASC por identificar. No obstante, normalmente, se ligan las moléculas de detección a otras zonas del anticuerpo de ASC que las moléculas de captura descritas previamente. Así surgen sobre la superficie de análisis, complejos ternarios de moléculas de captura, moléculas de detección y anticuerpos ASC. Se utilizan preferiblemente las moléculas de detección como compuestos conjugados. Son posibles asociados de conjugación enzimas, colorantes fluorescentes, oro y/o plata. Las enzimas particularmente preferibles son fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano, especialmente de origen equino, y/o glucosa oxidasa. Ejemplos adecuados de colorantes fluorescentes son la isotiocianato de fluoresceína y/o la cianina 3. Además, también deben tenerse en consideración otra serie de colorantes. Los expertos conocen sobradamente colorantes de este tipo. Otro asociado de conjugación preferido es la biotina. La molécula de detección biotilada se utiliza habitualmente junto con un compuesto conjugado de avidina o de estreptavidina y un asociado de conjugación idóneo, por ejemplo, la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano.
- 30 [0033] Además, la superficie de análisis se puede lavar antes de la detección de ASC. De esta forma se pueden eliminar las moléculas de detección no unidas de la superficie de análisis. Para lavar la superficie de análisis pueden usarse soluciones de lavado, en particular tampones químicos. Si fuese necesario podrían repetirse los pasos del lavado, en particular podrían repetirse varias veces.
- 35 [0034] Normalmente, la detección de ASC se realiza con una prueba colorimétrica. Por medio de la reacción de la prueba se originan spots coloreados (coloraciones) sobre la superficie de análisis, que dado el caso pueden solaparse entre sí. En casos excepcionales también se puede teñir la superficie de análisis completa. Los spots se pueden detectar y particularmente contar con un microscopio o con un sistema automático de análisis de imágenes. Comparar el número de spots con el número de células empleadas permite calcular la frecuencia o el número de células de reacción. Preferiblemente, la reacción de detección se cataliza por medio de una enzima. La reacción de detección se puede realizar, por ejemplo, con la ayuda de substratos apropiados, particularmente de cromogénicos. Substratos adecuados son, por ejemplo, paranitrofenilfosfato, carbazol o bromo-cloro-indolil fosfato. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina escinde el resto de fosfato del p-nitrofenilfosfato incoloro, con lo que surge el p-nitrofenol teñido de amarillo. La reacción se puede observar, por ejemplo, con un fotómetro. La intensidad del color es proporcional a la concentración de p-nitrofenol y también a la concentración de anticuerpos de las ASC por probar.
- 40 [0035] En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención se mide el número de células secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno (ASC). A tal efecto, se puede determinar sustancialmente el número de spots que aparecen sobre la superficie de análisis. Alternativamente o en combinación a esto, se mide cuantitativamente preferiblemente la intensidad de color de cada spot o de los spots que se solapan, en se caso también de las coloraciones que cubren la superficie de análisis total. Es especialmente preferible descomponer la superficie de análisis en una variedad de puntos individuales, medir la intensidad de color de cada punto individual por separado y añadir los valores de intensidad medidos. Esta particularmente previsto según la invención, que se registren de 1 a 2 millones, particularmente aprox. 1,5 millones de puntos de imagen (píxeles) por superficie de análisis. Para captar los píxeles se puede utilizar, por ejemplo, una cámara. Para medir la intensidad de color de un punto individual se dispone sobre la superficie de análisis con ventaja particular de entre 200 y 300, particularmente entre 220 y 260, preferiblemente aprox. 256 diferenciaciones (valores de gris). Los píxeles se pueden procesar y analizar, por ejemplo, con un aparato de lectura. Preferiblemente, se mide el número total de píxeles así como en particular su intensidad con ayuda de un analizador de imagen. De esta forma resulta posible medir la coloración total en lo que se refiere a la superficie

de análisis o a una parte determinada de esta. Un punto de color natural sobre la superficie de análisis puede servir como valor de referencia, en caso necesario también en otra superficie de análisis. La medida de la actividad total, es decir, la intensidad total de la reacción de todas las células eucariotas ante un antígeno definido sobre la superficie de análisis resulta del número del píxeles estimulados (teñidos), multiplicado por el valor de color (por ejemplo, tonos de gris entre 0 y 256) de cada píxel estimulado. Esto producto se divide de forma conveniente entre 1000 para obtener valores numéricos (unidades) fácilmente manejables. Los píxeles se registran y analizan preferiblemente desde arriba, es decir, por encima de la superficie de análisis. El tratamiento hacia una imagen bidimensional se realiza usualmente con ayuda de técnicas de ordenador.

[0036] Usualmente, en la producción de imágenes se utilizan sistemas de filtros adecuados. Preferiblemente se utilizan sistemas de filtros, particularmente, juegos de filtros, con filtro de banda estrecha. Está previsto particularmente, según la invención, que para probar las células eucariotas en cuanto a ASC se trabaje con un filtro de estimulación de banda estrecha y un filtro de bloqueo de banda estrecha por juego de filtros utilizado. Los juegos de filtros se pueden fusionar con un conductor de rayos para integrar en un bloque de filtro.

[0037] En otra forma de realización se pueden tomar medidas mediante las que disminuya la coloración producida sobre la superficie de análisis en la intensidad por punto individual en comparación con el estado de la técnica y/o aumente en la extensión de la superficie, es decir, en el número de puntos individuales por célula. Mediante el aumento de la extensión de la superficie se debilitará particularmente la coloración por unidad de superficie y por lo tanto, las diferencias de coloración entre las superficies individuales y/o dentro de una superficie mayor serán más evidentes. De este modo se puede medir la intensidad de color de los puntos individuales en el sector medible técnicamente. Así, también se pueden registrar superficies teñidas de forma intensiva, cuya intensidad sobrepasa el valor máximo constatable técnicamente, a causa del aumento de la extensión superficial. Con el método de medición descrito en los apartados anteriores se puede mejorar la evaluación del estado de infección un paciente.

[0038] El procedimiento según la invención sirve sobre todo para comprobar el estado de infección y diferenciar infecciones o enfermedades infecciosas agudas por un lado e infecciones o enfermedades infecciosas latentes o infecciones o enfermedades infecciosas superadas por otro. La denominación para caracterizar el estado inmune puede variar dependiendo de la infección o enfermedad infecciosa. De esta forma, en relación con la tuberculosis se habla de infecciones agudas y latentes. Por el contrario, en el caso de la borreliosis usualmente se utiliza la denominación activas y crónicas. Además, el procedimiento según la invención también sirve para comprobar la inmunidad vacunal, es decir, con ayuda del procedimiento se puede valorar si la inmunidad vacunal es todavía suficiente o si es necesaria una revacunación.

[0039] Las infecciones y/o enfermedades infecciosas son la tuberculosis y/o la borreliosis.

[0040] La presente invención se refiere además a la utilización de un kit (descrito en la reivindicación 12) al diagnóstico in vitro y/o monitorización de terapia in vitro de infecciones y/o enfermedades infecciosas para la distinción entre infecciones agudas por un lado e infecciones latentes o superadas por otro, incluyendo al menos un componente para comprobar células secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno (ASC). Se consideran componentes del kit, en particular, las moléculas de captura, las moléculas de detección, los colorantes de quimioluminiscencia, los colorantes fluorescentes y/o los antígenos. Los componentes pueden estar presentes en forma de dispersiones acuosas y/o en forma seca, por ejemplo, de forma liofilizada. El kit comprende dos o más componentes que están preferiblemente separados el uno del otro. En lo que respecta a otras características y propiedades del kit se toma como referencia la descripción anterior.

[0041] Otros detalles y características de la invención se deducen de las formas de realización preferibles de la siguiente descripción en forma de ejemplos en relación con las reivindicaciones secundarias. Las respectivas características pueden realizarse por si mismas o en combinación con varias características.

#### **Ejemplo 1:**

Prueba de agente patógeno de tuberculosis

[0042] Para llevar a cabo el procedimiento se usa una placa perforada 96. En primer lugar, se inmovilizan los anticuerpos como moléculas de captura en el fondo de las cavidades de la placa perforada. Los anticuerpos utilizados están dirigidos específicamente contra los anticuerpos de las células secretoras de anticuerpos específicos de los agentes patógenos de tuberculosis. Después, se inmoviliza el PPD como agente patógeno de tuberculosis en el suelo de las cavidades. Adicional o alternativamente, también se pueden utilizar los péptidos del denominado complejo RD1 y RD2. Además, se pueden utilizar también otras proteínas de *Mycobacterium Tuberculosis* (38 kD, 41 kD, 44 kD, 64 kD). Posteriormente, se añaden por cavidad de 100.000 a 250.000 PBMC (células mononucleares de sangre periféricas). La incubación de las células sanguíneas (junto a los agentes patógenos de tuberculosis) se efectúa durante un período de aprox.18 horas a aprox. 37 °C. Después, se decantan las células y se lava la placa perforada varias veces. A continuación, se añade otro anticuerpo que está conjugado con fosfatasa alcalina (detection capture molecule). Se efectúa otra

incubación a aprox. 37 °C en un período de 4 a 12 horas. A continuación, se limpian los antianticuerpos conjugados no ligados del fondo de la placa de perforación 96. Tras la adición del paranitrofenilfosfato se examinan las superficies de análisis (fondos de las cavidades) en busca de las coloraciones surgidas. Si ningún spot presenta color (coloraciones), la reacción es negativa. Esto significa que no hay ninguna placa de plasma específica de tuberculosis (ASC) entre las células sanguíneas. De tal modo, el paciente, cuyas células sanguíneas fueron examinadas, no padece ni tuberculosis aguda ni activa. En este sentido, el resultado en este paciente es o bien negativo o bien el paciente padece tuberculosis latente o ya superada, no activa.

**Ejemplo 2:**

Prueba de borreliosis

[0043] Para llevar a cabo el procedimiento se usa una placa perforada 96. Se inmovilizan los antianticuerpos en los fondos de las cavidades de la placa perforada. Dichos antianticuerpos están dirigidos específicamente contra los anticuerpos de las células secretoras de anticuerpos específicos de la borreliosis. A continuación, se utilizan antígenos específicos de la borreliosis, por ejemplo, los péptidos OSP A, OSP B, OSP C y/o VIsE fragmento flagelina interna. Los antígenos específicos de la borreliosis se acoplan al fondo de las cavidades con una concentración de 1 a 10 µg/ml. Después, se añaden por cavidad de 100.000 a 250.000 PBMC (células mononucleares de sangre periférica). Las células sanguíneas se incuban (junto a antígenos específicos de la borreliosis) durante un período de aprox. 18 horas a aprox. 37 °C. Después se decantan las células sanguíneas y se lava la placa perforada varias veces. A continuación, se añade otro antianticuerpo que está conjugado con fosfatasa alcalina. Se efectúa otra incubación a aprox. 37 °C en un período de 4 a 12 horas. A continuación, se limpian los antianticuerpos conjugados no ligados de la placa. Tras la adición del paranitrofenilfosfato se examina el fondo de las cavidades en busca de las coloraciones surgidas. Si aparecen colores en los spot de los fondos de las cavidades, quedará probado que entre las células sanguíneas hay ASC específicas de borreliosis. En este caso, el diagnóstico será borreliosis aguda o borreliosis activa. Si por el contrario no hay coloraciones, esto significa que se trata de borreliosis latente o superada.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico in vitro y/o monitorización de terapia in vitro de tuberculosis y/o borreliosis, especialmente para la distinción entre infecciones agudas (activas) por un lado e infecciones latentes (crónicas) o superadas por otro, **caracterizado por el hecho de que** se incuban células eucariotas con al menos un antígeno específico de tuberculosis y/o al menos un antígeno específico de borreliosis y se prueban en cuanto a las células secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno (ASC), donde los anticuerpos secretados se dirigen específicamente contra el antígeno, donde la incubación de las células eucariotas se realiza durante un período de entre 2 y 18 horas.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** se enriquecen las células eucariotas antes de incubación.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** se liberan las células eucariotas de los eritrocitos antes de la incubación.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** se liberan las células eucariotas del suero sanguíneo, particularmente suero sanguíneo autólogo, antes de la incubación.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** para la incubación de las células eucariotas se usan como antígeno epítopes patógenos.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** para la incubación de las células eucariotas se utiliza al menos un antígeno del grupo PPD, RD 1, RD 2, ESAT 6, CFP 10, MPT 41, MTB 64, PPE 44, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D, OSP E y VIsE.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** para la incubación de las células eucariotas se utiliza al menos un antígeno específico de tuberculosis del grupo PPD, RD 1, RD 2, MPT 64, MTB 41 y PPE 44.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado por el hecho de que** para la incubación de las células eucariotas se utiliza al menos antígeno específico de borreliosis del grupo VIsE, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D y OSP E.
- 45 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** se lleva a cabo el método ELISPOT, particularmente incluyendo los siguientes pasos:
- 50 a) aplicación de moléculas de captura sobre una superficie de análisis,  
 b) incubación de las células eucariotas con el antígeno sobre la superficie de análisis,  
 c) adición de moléculas de detección sobre la superficie de análisis,  
 d) detección de ASC sobre la superficie de análisis, cuyo anticuerpos secretados específicos están dirigidos específicamente contra el antígeno.
10. Aplicación del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la comprobación de la inmunidad vacunal.
11. Uso del procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 hasta la 9 para valorar el estado inmune, especialmente para distinguir entre infecciones agudas por un lado e infecciones latentes o superadas por otro.
12. Uso de un kit, que comprende al menos un componente para la prueba de células secretoras de anticuerpos específicos de un antígeno (ASC), particularmente moléculas de captura, moléculas de detección, colorantes de quimioluminiscencia, colorantes fluorescentes y/o antígenos, en un procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 hasta la 9.