

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 342**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2008 PCT/EP2008/009112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09056282**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008 E 08843381 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2223111**

54 Título: **Método ELISPOT con dos sistemas de filtros**

30 Prioridad:
29.10.2007 DE 102007052517

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2017

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

ES 2 643 342 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

Método ELISPOT con dos sistemas de filtros

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un método ELISPOT para el diagnóstico in vitro y/o en control terapéutico in vitro de tuberculosis o borreliosis.
- 10 [0002] El llamado "ensayo inmunospot ligado a enzimas" (ELISPOT) se usa entre otras cosas para la medición de la actividad antigénica específica de células sanguíneas. La prueba se realiza habitualmente en placas de microtítulo con 96 cavidades, donde cada cavidad lleva en el suelo una membrana, y en caso de que la prueba resulte positiva, se forma sobre la membrana una reacción de color local alrededor de células individuales activadas. La evaluación tiene lugar a través del recuento sencillo de los puntos o bajo aplicación de sistemas de procesamiento de imágenes digitales, donde además del número de puntos también se pueden cuantificar el tamaño e intensidad de los puntos.
- 15 La reacción de color se basa en la prueba de transmisores químicos formados localmente, que se ligan por medio de membrana anticuerpos primarios acoplados. Estos mensajeros ligados localmente se visualizan a través del enlace de un segundo, anticuerpo orientado contra el mismo transmisor químico, que se acopla directa o indirectamente a una reacción de color.
- 20 [0003] Hasta ahora, con la medición de la actividad de células se midió únicamente el número de células reactivas, para sacar a ahí deducciones sobre su actividad. A este respecto, sin embargo, se reconoció, que no depende mucho o no sólo del número de células reactivas, sino sobre todo también de la calidad de la reacción de las células individuales. De esta manera células individuales pueden reaccionar al mismo antígeno de diversas formas, lo que se manifiesta en la cantidad de los transmisores químicos y con ello en la cantidad de la
- 25 reacción de color de cada célula individual mencionada en la sección precedente. En el documentos EP 0 957 359 A2 se describe un método ELISPOT, en el que se determina no sólo el número de las células reactivas, sino también la intensidad de la reacción global. Esto permite conclusiones esencialmente más profundas sobre la actividad de las células.
- 30 [0004] Shirai et al. (Cytokine 1994, Vol. 6, nº 3: 329 - 336) examina la liberación estimulada por antígenos de dos citoquinas a través de líneas celulares T de ratón con ayuda de un método ELISPOT efectuado por separado para cada citoquina, donde la detección se basa en una reacción colorimétrica.
- 35 [0005] Del documento WO 90/04182 A1 se conoce un método basado en ELISPOT para la detección simultánea de antígenos o anticuerpos secretados, donde la detección se basa también en una reacción colorimétrica.
- [0006] El documento WO 98/23960 A1 se refiere a un método basado en ELISPOT para la detección de citoquina segregada por células T, donde las células T fueron previamente sensibilizadas con un antígeno in vivo.
- 40 [0007] El documento WO 02/08754 A1 describe un método ELISPOT de dos colores para la detección de dos analitos, donde el método se realiza en una célula del flujo.
- 45 [0008] Del documento WO 2005/106482 A1 se conoce un método ELISPOT para la detección de varias citoquinas, donde las citoquinas individuales espacialmente separadas entre sí se detectan con ayuda de otro anticuerpos de captura inmovilizados.
- [0009] Un método de detección de células secretoras de citoquina se conoce del documento US 2003/0215791 A1.
- 50 [0010] Un problema fundamental del método ELISPOT consiste sin embargo en el registro deliberado de células, que en presencia de un antígeno segregan dos o más transmisores químicos diferentes. Otro problema consiste en captar estas células de forma separada de otras células, que únicamente segregan un transmisor químico.
- 55 [0011] Como ya se mencionó de forma introductoria, la medición se basa en células en el marco del método ELISPOT generalmente sobre reacciones de color, que provienen de propiedades quimioluminiscentes o fluorescentes de colorantes correspondientes. Los sistemas de filtros utilizados habitualmente para la medición de la fluorescencia o quimioluminiscencia se basan usualmente en un único conjunto de filtros, que es permeable respecto a la estimulación y emisión de un colorante sólo para luz de un rango de longitudes de ondas determinado.
- 60 Es cierto que mientras tanto también entran en aplicación los llamados filtros duales. Desventajoso a este respecto es, sin embargo, que estos filtros son permeables a un rango espectral relativamente amplio.
- 65 Puesto que los colorantes generalmente pueden absorber y emitir luz también fuera de su rango espectral "ideal", la aplicación de filtros duales para la medición de células que segregan dos o más transmisores químicos

diferentes, llevaría a una restricción considerable de la precisión de medición.

Este problema se ve reforzado por el hecho de que los transmisores químicos usualmente se segregan en diferentes cantidades de las células mencionadas.

5 [0012] La invención se propone por tanto la tarea de poner a disposición un método ELISPOT, que evite las desventajas conocidas del estado de la técnica y particularmente sea adecuado para una medición sensitiva de células, que segregan dos o más transmisores químicos diferentes.

10 [0013] Esta tarea se resuelve según la invención a través de un método con las características de la reivindicación independiente 1.

Formas de realización preferidas del método son objeto de las reivindicaciones dependientes 2 hasta 9.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización del método según las reivindicaciones independientes 10 y 11.

El contenido de todas las reivindicaciones se entiende aquí con referencia al contenido de esta descripción.

15 [0014] El método conforme a la invención es un método ELISPOT ("Ensayo de inmunospot ligado a enzimas"), especialmente para el diagnóstico in vitro y/o control terapéutico in vitro de infecciones y/o enfermedades infecciosas, donde células eucarióticas se miden preferiblemente sobre una superficie de análisis o un soporte, son incubadas con un antígeno y se mide el número de células inmunocompetentes, que segregan al menos dos citoquinas diferentes como reacción al antígeno, donde para la medición de las células inmunocompetentes estas se visualizan al menos con ayuda de dos colorantes diferentes y al menos dos conjuntos de filtros diferentes, donde los conjuntos de filtros presentan filtros de banda estrecha, como se define en las reivindicaciones.

20 A través de la invención se pone a disposición un método ELISPOT, que permite una captación selectiva de células inmunes, que segregan dos o más citoquinas diferentes frente a otras células inmunes, que únicamente segregan un tipo de citoquina.

25 La medición selectiva de las células inmunes mencionadas se basa según la invención en el uso de conjuntos de filtros diferentes con filtros de banda estrecha, cuya transmisión limitada (translucidez) para luz de excitación y luz de emisión de colorantes permite una captación selectiva de fluorescencias de colorantes (filtros de banda estrecha son filtros de paso de banda, que sólo son permeables para un campo espectral pequeño). Con ventaja particular se puede evitar de esta manera, que interfieran luminiscencias de colorantes diferentes y particularmente luminiscencias débiles sean sobrepuestas por luminiscencias fuertes.

30 De esta manera, en comparación con los métodos ELISPOT conocidos del estado de la técnica, se consigue una sensibilidad aumentada de manera notable para células inmunes, que en presencia de un antígeno segregan dos o más citoquinas diferentes.

35 [0015] En una forma de realización particularmente preferida se usan por conjunto de filtros filtros de banda estrecha, que son respectivamente complementarios a las características espectrales de uno de los colorantes. De esta manera se pueden evitar de una manera ventajosa las superposiciones de luminiscencia mencionadas. Los conjuntos de filtros pueden presentar además de filtros de banda estrecha también filtros de banda ancha. Sin embargo, para la visualización de células inmunocompetentes se usan preferiblemente conjuntos de filtros, que presentan exclusivamente filtros de banda estrecha.

40 Según la invención se prevé que cada conjunto de filtros consista en dos filtros de banda estrecha, como se define en las reivindicaciones.

45 Por cada conjunto de filtros se trabaja generalmente con diferentes tipos de filtro de banda estrecha.

Preferiblemente se usa por cada conjunto de filtros un filtro de excitación de banda estrecha y un filtro de bloqueo de banda estrecha. El filtro de estimulación de banda estrecha posee convenientemente una permeabilidad (transmisión) a la luz a ser posible alta, que está prevista para la estimulación de luminiscencia de los colorantes. En caso de fluorescencia la luz de onda larga (pobre en energía) se mantiene alejada de este tipo de filtro de banda estrecha y por lo tanto no está a disposición para una estimulación de los colorantes. El filtro de bloqueo de banda estrecha presenta por el contrario normalmente una permeabilidad alta a la luz emitida por los colorantes. En caso de la fluorescencia la luz de excitación de onda corta (rica en energía) se elimina a ser posible completamente.

50 [0016] En los conjuntos de filtros se usan filtros de excitación de banda estrecha, que son permeables a rangos de longitudes de ondas de luz que esencialmente no se solapan, particularmente luz de onda corta.

55 [0017] Los filtros de bloqueo de banda estrecha utilizables en los conjuntos de filtros son permeables para rangos de longitudes de ondas que esencialmente no se solapan, particularmente de luz de onda larga.

60 [0018] En el marco del método según la invención se usan colorantes fluorescentes.

En el marco del método según la invención se mide correspondientemente la fluorescencia de colorantes.

65 [0019] Como posibles colorantes fluorescentes en el marco del método según la invención se pueden usar particularmente derivados de cumarina, derivados de rodamina, derivados de auramina, cianina (Cy), ficoeritrina, alofocianina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Texas Red, 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), propidio

yoduro, Sp. verde, Sp. naranja, L. amarillo, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente de ciano (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP, Proteína Fluorescente Amarilla) y/o proteína fluorescente verde acentuado (EGFP).

Ejemplos de cianinas adecuadas son cianina 2, cianina 3, cianina 5.5, y/o cianina 5.

5 Un ejemplo de un derivado de rodamina adecuado es Tetrametil-Rodamina-Isotiocianato (TRITC).

[0020] Según la invención pueden emplearse las combinaciones de los siguientes colorantes : FITC/Texas Red, DAPI/FITC, DAPI/GFP, DAPI/Cy3, DAPI/TRITC, DAPI/Texas Red, DAPI/Cy5, FITC/TRITC, Sp. Verde/SP. Naranja, Cy2/Cy3, L. Amarillo/Rodamina, FITC/Cy3, FITC/propidio yoduro, FITC/Cy5 y/o Cy3/Cy5.

10 [0021] Preferiblemente se usan en el marco del procedimiento según la invención conjuntos de filtros fluorescentes.

Los filtros fluorescentes utilizables pueden ser vidrios de color (filtros de absorción), filtros de interferencia o combinaciones de estos.

15 Preferiblemente entran en aplicación filtros de interferencia.

[0022] Según otra forma de realización preferida para la visualización de las células inmunocompetentes se usan al menos un conjunto de filtros con un filtro de banda estrecha para isotiocinato de fluoresceína y al menos un conjunto de filtros con un filtro de banda estrecha para cianina 3. El filtro de banda estrecha, que está previsto para la excitación de isotiocinato de fluoresceína presenta preferiblemente una permeabilidad a la luz en el rango de longitudes de ondas de entre 460 y 500 nm. El filtro de banda estrecho, que está previsto para la emisión de isotiocinato de fluoresceína, presenta preferiblemente una permeabilidad a la luz en el rango de longitudes de ondas entre 512 y 542 nm.

20 La zona de translucidez preferida para un filtro de banda estrecha, que está previsto para la estimulación de cianina 3, se encuentra en el rango de longitudes de ondas de entre 541 y 551 nm. La zona de translucidez para un filtro de banda estrecha, que está previsto para la emisión de cianina 3, se encuentra preferiblemente en un rango de longitudes de ondas de entre 572 y 647 nm.

[0023] En el marco del procedimiento según la invención se usan normalmente conjuntos de filtros, que además de los filtros de banda estrecha presentan un así llamado separador de rayos. El separador de rayos se ocupa con ventaja particular de una conducción óptima de luz. Así, en el caso de fluorescencia se refleja una luz de onda corta, mientras que la luz de onda larga puede pasar por el separador de radiación casi sin obstáculos. De esta manera está por un lado la luz de excitación "desviada" hacia la dirección de los colorantes.

30 Por otra parte, el separador de rayos actúa de manera particularmente ventajosa como barrera adicional para luz de onda corta, que por lo demás sería un obstáculo para la visualización de células inmunocompetentes.

35 Según la invención está particularmente previsto, que el filtro de banda estrecha que se puede utilizar en el marco del método según la invención, particularmente un filtro de excitación de banda estrecha y un filtro de bloqueo de banda estrecha, forman juntos con un separador de rayos una unidad funcional y se integran preferiblemente de forma mecánica en un único elemento, un así llamado bloque de filtro.

40 El método según la invención se puede realizar por lo tanto particularmente con al menos dos bloqueos de filtro del tipo descrito anteriormente.

[0024] Además, los conjuntos de filtros pueden ser dispuestos sobre una rueda de filtro preferiblemente giratoria.

45 El giro de la rueda de filtro se puede lograr por ejemplo con un motor de paso a paso.

[0025] Conforme a lo anteriormente mencionado, una ventaja esencial del método según la invención consiste en que según el filtro de banda estrecha se puede captar específicamente la luminiscencia de un colorante con sus características espectrales, en particular la máxima absorción y emisión, sin que se llegue a una superposición molesta con una luminiscencia de otro colorante. Correspondientemente es preferible que para la visualización de las células inmunocompetentes se midan de forma separada las luminiscencias de los colorantes. Preferiblemente, a tal objeto, por cada planteamiento de prueba, particularmente por cavidad o agujero o hundimiento de una placas de microtítulo, se producen para la visualización de las células inmunocompetentes al menos dos imágenes bidimensionales. Las imágenes bidimensionales se producen normalmente de forma que para la visualización de las células inmunocompetentes las imágenes a color producidas inmediatamente se agrandan ópticamente y se dividen en píxeles, que son registrados y evaluados por separado por un aparato de lectura. Los píxeles pueden ser leídos como líneas.

Un ordenador puede entonces componer una imagen bidimensional de los valores lineales obtenidos.

50 En el marco del método según la invención, para la medición de las células inmunocompetentes al menos preferiblemente dos fotografías bidimensionales producidas con la visualización se colocan una sobre la otra.

60 Por el solapamiento de las fotografías, que se realiza usualmente con ayuda de un software idóneo para ello, se identifican las células inmunocompetentes por medir y particularmente se distinguen de otras células.

[0026] En principio, para la visualización de las células inmunocompetentes se puede determinar el número de spots que aparece sobre una superficie de análisis o un soporte. De forma alternativa o en combinación se mide de forma cuantitativa preferiblemente la intensidad del color de spots individuales o spots solapados,

65

opcionalmente también de coloraciones que cubren una superficie de análisis. De forma particularmente preferida una superficie de análisis se descompone en una multiplicidad de puntos individuales, que adiciona la intensidad de color de cada punto medido individual y los valores de intensidad medidos. Según la invención se pueden detectar hasta 2 millones, particularmente aprox. 1,5 millones, píxeles (pixel) por superficie de análisis.

5 El registro de los píxeles se puede realizar por ejemplo con ayuda de una cámara. Para la medición de la intensidad de color de un punto individual sobre una superficie de análisis están a disposición con ventaja especial entre 200 y 300, particularmente entre 220 y 260, preferiblemente aprox. 256 escalonamientos (valores en gris). El tratamiento y evaluación de los píxeles se puede realizar por ejemplo con un aparato de lectura. Preferiblemente, el número total de los píxeles así como particularmente su intensidad se mide con ayuda de un
10 así llamado analizador de imagen. De esta manera es posible una medición de la coloración total, con respecto a una superficie de análisis o una parte determinada de la misma.

Como valor de referencia puede servir un punto de color natural sobre una superficie de análisis, en su caso también sobre la otra superficie de análisis.

15 Como medida para la actividad total, es decir, la intensidad global de las reacciones de todas las células sobre una superficie de análisis a un antígeno definido, el producto se puede formar a partir del número de píxeles (coloreados) excitados y el valor de color (por ejemplo, grados de gris entre 0 y 256) de cada píxel excitado. Este producto se divide convenientemente entre 1000, para recibir valores numéricos fácilmente manejables (unidades). La captación y evaluación de los píxeles se realiza preferiblemente desde arriba, es decir, encima de una superficie de análisis. El tratamiento hacia una imagen bidimensional se realiza normalmente, como ya
20 mencionado, con ayuda de técnicas de ordenador.

[0027] Normalmente se usan para la fase de incubación células eucarióticas de origen humano o animal. Preferiblemente, entran en aplicación células humanas. Las células eucarióticas provienen generalmente de un material de análisis biológico. El material de análisis puede consistir en líquidos corporales, por ejemplo sangre,
25 linfa, líquido de articulaciones y/o segregaciones mucosas. El material de análisis puede consistir por ejemplo en una muestra de sangre, un frotis cervical o un lavado bronquial. Se usan preferiblemente muestras de sangre. Correspondientemente según la invención es preferible que se usen como células eucarióticas células sanguíneas.

30 Las células sanguíneas pueden ser particularmente linfocitos B, linfocitos T, granulocitos, células dendríticas, macrófagos y/o eritrocitos. Por células inmunocompetentes en el sentido de la invención se deben entender células inmunes, particularmente células sanguíneas, como se relacionan en esta sección.

[0028] Preferiblemente, las células eucarióticas se enriquecen antes de la incubación con el antígeno, particularmente son liberadas de eritrocitos. Un enriquecimiento de las células eucarióticas se puede realizar con ayuda técnicas de celulares de enriquecimiento convencionales. Por ejemplo, las células eucarióticas se pueden
35 enriquecer a través precipitado, particularmente, precipitado de gradientes. Para el precipitado de gradientes se pueden usar por ejemplo gradientes de azúcar. En una forma de realización adicional, las células eucarióticas, preferiblemente antes de de la incubación con el antígeno, se liberan de suero sanguíneo, particularmente suero sanguíneo autólogo. Esto se realiza normalmente partiendo de una muestra de sangre obtenida mediante la
40 separación del porcentaje sanguíneo líquido de los componentes celulares.

Respecto a los componentes celulares y técnicas de separación apropiadas se hace referencia a las indicaciones hechas en este párrafo.

45 [0029] El procedimiento según la invención se realiza normalmente sobre una superficie de análisis adecuada para ello o sobre un soporte adecuado, particularmente en un recipiente de análisis.

La superficie de análisis o el soporte puede consistir por ejemplo en fondos de cavidad o de agujero (Wells) de las así llamadas placas perforada o de placas de agujeros. Las placas de microtítulo o perforada de este tipo, que según la invención se emplean preferiblemente como recipientes de análisis, están disponibles
50 comercialmente, particularmente con un número diferente de agujeros o cavidades. Así, el método según la invención se puede realizar por ejemplo con ayuda de una placa perforada-96. Por agujero de la placa de microtítulo se pueden utilizar hasta un millón de células. En la sangre están contenidos normalmente un millón de células en un mililitro de sangre, de modo que en el caso de una placa perforada-96 se pueden utilizar aprox. 96 ml de sangre. Las placas de microtítulo pueden presentar además un diámetro de cavidad de aprox. 5 mm, lo que corresponde a una base inferior de aproximadamente 20 mm². La superficie de análisis utilizada es
55 convenientemente llana. De esta manera se pueden evitar diferencias de concentración locales con la realización del procedimiento según la invención. Además, superficies de análisis planas son esencialmente mejores para la producción de capas celulares simples (monocapa). Materiales típicos, de los que están formados recipientes de análisis adecuados, son por ejemplo poliestireno, fluoruro de polivinilideno (PVDF), nitrocelulosa y nilón.

60 [0030] En una forma de realización preferida se usan para la medición de las células inmunocompetentes al menos dos moléculas de captura diferentes y al menos dos moléculas de detección diferentes.

Las moléculas de captura y de detección son preferiblemente respectivamente específicas para una de las citoquinas segregadas. Típicamente se usa por citoquina segregada una molécula de captura y una molécula de detección correspondiente. Las moléculas de detección y de captura se ligan normalmente en diferentes puntos
65 de las citoquinas segregadas. Así, se forman normalmente estructuras complejas ternarias a partir de moléculas de captura, citoquinas segregadas y moléculas de detección. Como moléculas de detección y de captura se usan

generalmente anticuerpos, así llamados anticuerpos de captura y anticuerpos de detección.

Las moléculas de captura y/o detección pueden consistir particularmente en anticuerpos monoclonales y/o policlonales. Se prefieren los anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, las moléculas de detección que se pueden usar en el marco del método según la invención, están marcadas respectivamente con uno de los colorantes. La marca se basa en general en ligamentos covalentes. Las moléculas de detección forman normalmente una conexión conjugada con los colorantes, donde las moléculas de detección y los colorantes están preferiblemente unidos entre sí por enlace covalente.

[0031] Se mide el número de células inmunocompetentes, que segregan al menos un interferón γ y al menos una interleuquina.

[0032] Preferiblemente, en el marco del método según la invención se miden células inmunocompetentes, que segregan tanto interferón γ como también Interleuquina-2.

Preferiblemente estas células consisten en células T (linfocitos T), particularmente células- T_{H1} , preferiblemente células de memoria derivadas de estas. Sorprendentemente se ha podido constatar que este tipo de célula está presente durante las diferentes fases de una infección en diferentes cantidades en líquidos corporales, particularmente sangre. Así, se pudieron detectar grandes cantidades de este tipo de célula sobre todo en muestras de sangre de personas examinadas, que o bien padecían de una infección latente o bien en las que una infección había desaparecido por un período prolongado, de modo que la infección se podía considerar esencialmente como superada. Las muestras de sangre de estas personas presentaban típicamente una proporción de entre 30 y 50 % o más del tipo de célula mencionado, con respecto al número total de células contenidas en la muestra. Por el contrario, las muestras de sangre de personas que padecían una infección aguda, presentaban una proporción claramente inferior del tipo de célula cuestionable.

Generalmente las muestras de sangre examinadas con ayuda del método según la invención de personas examinadas, que padecían de una infección aguda, presentaban una proporción del tipo de célula cuestionable de entre 10 y 20%, con respecto al número total de células contenidas en el análisis de sangre.

Por consiguiente, la medición de células inmunocompetentes, que segregan tanto interferón γ como también Interleuquina-2, es de manera especialmente ventajosa adecuada para una valoración del estado inmunológico, especialmente para la distinción entre infecciones agudas por un lado e infecciones latentes o superadas por otra parte.

Además, la medición de células inmunocompetentes, que segregan interferón γ e Interleuquina-2, es adecuada para el control de vacunación.

Si se pueden probar muchas células de este tipo, esto significa un buen estado de vacunación.

[0033] Preferiblemente se usan fragmentos de tipos de agentes patógenos, particularmente receptores de agentes patógenos como antígenos.

Los epítomos consisten particularmente en péptidos, preferiblemente oligopéptidos. Epítomos adecuados pueden estar formados de 5 hasta 25, particularmente 9 hasta 11, unidades de aminoácidos. En una forma de realización preferida, para la incubación de las células eucarióticas se usa 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.

[0034] Para la incubación de las células eucarióticas se usa al menos un antígeno específico de tuberculosis, particularmente del grupo PPD, RD 1, RD 2, MPT 64, MTB 41 y PPE 44.

Para la incubación de las células eucarióticas se usa al menos un antígeno específico de borreliosis, particularmente del grupo VIsE, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D y OSP E.

[0035] Las infecciones o enfermedades infecciosas, que se pueden diagnosticar in vitro o cuyo transcurso terapéutico se puede vigilar in vitro, consisten en tuberculosis o borreliosis.

El método según la invención es particularmente preferido para la valoración del estado inmunológico, especialmente para la distinción entre infecciones agudas o activas por un lado e infecciones latentes, crónicas o superadas por otra parte. Como ya se ha mencionado, en el marco de invención se ha podido demostrar que las infecciones agudas se caracterizan por un número pequeño de células inmunocompetentes, que segregan (secretan) tanto interferón γ como también Interleuquina-2, particularmente en relación a células que solo segregan interferón γ . Por el contrario, en infecciones latentes las proporciones se encuentran justo invertidas.

[0036] Según la infección o enfermedades infecciosas se usan denominaciones diversas para el estado de la infección. Así, en el caso de la tuberculosis se habla de infecciones agudas y latentes o enfermedades infecciosas. La tuberculosis aguda representa un estadio activo de la enfermedad. Los pacientes que sufren de una tuberculosis aguda producen agentes patógenos de tuberculosis y son infecciosos (contagiosos). Las infecciones latentes de tuberculosis no son infecciosas en este contexto. Normalmente no es demostrable al menos directamente ningún agente patógeno de tuberculosis.

Por el contrario, en la borreliosis se usan normalmente las denominaciones infecciones activas y crónicas o enfermedades infecciosas. Según la invención se prefiere particularmente que el control del estado inmunológico se lleve a cabo por la medición de las células inmunocompetentes ya mencionadas, que segregan tanto

interferón- γ como también Interleuquina-2 en presencia de un antígeno. Además, el método es adecuado también para el pronóstico de vacunas o para la valoración del estado de vacunas. Con ayuda del método según la invención se puede comprobar por lo tanto con ventaja particular si hay una protección de vacunación suficiente o en su caso es necesaria una revacunación. Con respecto a otras características y detalles, se remite por lo tanto a la descripción precedente.

[0037] Otros detalles y características de la invención resultan de la descripción sucesiva de la representación del método según la invención por medio de dos ejemplos en relación con las figuras y reivindicaciones secundarias.

Las características respectivas a este respecto se pueden realizar por sí mismas o varias en combinación. Las figuras se realizan con referencia explícita al contenido de esta descripción.

[0038] En las figuras se muestran esquemáticamente:

Figura 1: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha (Bright Line HC 593/40, divisor de haz-HC BS 562, Bright Line HC 543/22) adecuado para la detección de los colorantes Cianina 3, TRITC y Alexa 546,

Figura 2: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha (Bright Line HC 520/35, divisor de haz-HC BS 495 y Bright Line HC 472/30) adecuado para la detección de los colorantes FITC, EGFP, Cianina 2 y Alexa 488,

Figura 3: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha (Bright Line HC 447/60, divisor de haz-HC BS 409, Bright Line HC 387/11) adecuado para la detección del colorante DAPI,

Figura 4: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha (Bright Line HC 692/40, separadores de radiación-HC BS 660, Bright línea HC 628/40) adecuado para la detección de los colorantes Cianina 5 y Alexa 647,

Figura 5: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha (Bright Line HC 483/32, divisor de haz-HC BS 458, Bright Line HC 438/24) adecuado para la detección del colorante CFP,

Figura 6: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha (Bright Line HC 542/27, divisor de haz-HC BS 520, Bright Line HC 500/24) adecuado para la detección del colorante YFP,

Figura 7: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha adecuado para la detección de los colorantes Texas Red y mCherry (Bright Line HC 624/40, divisor de haz-HC BS 593, Bright Line HC 562/40),

Figura 8: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha adecuado para la detección del colorante Cy5.5 (Bright Line HC 716/40, separadores de radiación-HC BS 685, Bright Line HC 655/40),

Figura 9: las características espectrales de un juego de filtros de banda estrecha (Bright Line HC 775/46, divisor de haz-HC BS 741, Bright Line HC 710/40) adecuado para la detección del colorante Cy7.

[0039] En las figuras 1 hasta 8 está aplicada en la ordenada respectivamente la transmisión en porcentaje y en la ordenada la longitud de onda en nanómetros.

Ejemplo 1:

Certificado de agentes patógenos de tuberculosis

[0040] Para la realización del método se usa una placa perforada-96. Primero, dos anticuerpos diferentes se inmovilizan como moléculas de captura en los fondos de las cavidades de la placa perforada. Un anticuerpo está específicamente dirigido contra interferón- γ , el otro anticuerpo está dirigido específicamente contra Interleuquina-2. Después el PPD se inmoviliza como agente patógeno de tuberculosis en el fondo de las cavidades. Adicional o alternativamente se pueden usar también péptidos del complejo así llamado RD1- y -RD2. Además, se pueden usar también otras proteínas de Mycobacterium Tuberculosis (38 kD, 41 kD, 44 kD, 64 kD). A continuación se añaden por cavidad 100.000 hasta 250.000 PBMCs (células mononucleares de sangre periférica). La incubación de las células sanguíneas (junto con los agentes patógenos de tuberculosis) se realiza durante un período de aprox. 18 horas a aprox. 37 °C. A continuación se decantan las células y la placa perforada se lava varias veces. A continuación se añade un anticuerpo dirigido contra interferón- γ , que se marca de forma covalente con isotiocinato de fluoresceína, y un anticuerpo dirigido contra Interleuquina-2, que se marca de forma covalente con Cy3.

Se realiza nuevamente una incubación a aprox. 37 °C durante 4 hasta 12 horas. A continuación, los anticuerpos marcados con colorante no ligados se enjuagan del fondo de la placa perforada de la placa perforada-96.

Después se miden las fluorescencias de los colorantes. A este efecto se producen por cada agujero de la placa perforada dos imágenes, una en el ámbito espectral verde (fluorescencia verde de isotiocinato de fluoresceína) y

una en el ámbito espectral rojo (fluorescencia roja de Cy3). De esta manera se garantiza que no se solapen ni fluorescencias en verde débil ni en rojo débil por fluorescencias correspondientes en rojo fuerte o verde fuerte. Las imágenes se colocan a continuación una sobre otra.

De esta manera se pueden identificar y particularmente cuantificar células inmunocompetentes, que segregan tanto interferón- γ como también Interleuquina-2.

En caso de que la proporción de las células, que segregan tanto interferón- γ como también Interleuquina-2, fuera menor al 30% con respecto al número total de las células examinadas en total, las células provienen de pacientes que sufren de una tuberculosis aguda. En caso de que la proporción de este tipo de células se encuentre por encima del 30%, particularmente por encima de 30 hasta 50% o más, entonces las células provienen en total de pacientes que sufren de una infección de tuberculosis latente o de pacientes con una infección ya superada.

Ejemplo 2:

Prueba de borreliosis

[0041] Para la realización del método se usa una placa perforada-96. En los fondos de las cavidades de la placa perforada se inmovilizan dos antianticuerpos diferentes, que se dirigen específicamente contra interleuquina- γ o Interleuquina-2. A continuación se usan antígenos específicos de borreliosis, por ejemplo los péptidos OSP A, OSP B, OSP C y/o fragmento flaggellin internos de VlsE. Los antígenos específicos de borreliosis se acoplan al suelo de las cavidades en una concentración de 1 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$. A continuación se añaden por las cavidades 100.000 hasta 250.000 PBMCs (células mononucleares de sangre periférica). Las células sanguíneas se incuban (junto con los antígenos específicos de borreliosis) durante un período de aprox. 18 horas a aprox. 37 °C. A continuación las células sanguíneas se decantan y la placa perforada se lava varias veces.

A continuación se añade un anticuerpo dirigido contra interferón- γ , que se marca de forma covalente con isotiocinato de fluoresceína, y un anticuerpo dirigido contra Interleuquina-2, que se marca de forma covalente con Cy3.

Se realiza otra incubación a aprox. 37 °C durante 4 hasta 12 horas.

A continuación los anticuerpos marcados con colorante no ligados se enjuagan del fondo de la placa perforada de la placa perforada-96. Entonces se miden las fluorescencias de los colorantes, como se describe en el Ejemplo 1. En caso de que la proporción de células, que segregan tanto interferón- γ como también Interleuquina-2, sea menor al 30%, con respecto al número total de las células examinadas en total, las células provienen de pacientes, que sufren de una borreliosis activa. Si la proporción de este tipo de células se encuentra por encima del 30%, particularmente por encima del 30 hasta 50% o más, entonces las células provienen totalmente de pacientes, que sufren de una infección de borreliosis crónica o de pacientes con una infección ya superada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método ELISPOT para el diagnóstico in vitro y/o control terapéutico in vitro de tuberculosis o borreliosis, **caracterizado por el hecho de que** se incuban células eucarióticas con un antígeno específico de tuberculosis o borreliosis y se mide el número de células inmunocompetentes, que segregan al menos un interferón y al menos una interleuquina como reacción al antígeno, donde para la medición de las células inmunocompetentes estas se visualizan por lo menos con ayuda de dos colorantes fluorescentes diferentes y al menos dos conjuntos de filtros diferentes, donde los conjuntos de filtros presentan filtros de banda estrecha, donde en los conjuntos de filtros se usan filtros de excitación de banda estrecha, que en sí mismos son transparentes en el rango de longitudes de ondas de luz que esencialmente no se solapan, y filtros de bloqueo de banda estrecha, que en sí mismos son transparentes en el rango de longitudes de ondas de luz que esencialmente no se solapan.
- 10
- 15 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** por cada conjunto de filtros se usan filtros de banda estrecha, que son respectivamente complementarios a las características espectrales de uno de los colorantes, donde para la visualización se usan preferiblemente conjuntos de filtros, que presentan exclusivamente filtros de banda estrecha.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** se trabaja por cada conjunto de filtros con dos filtros de banda estrecha, donde preferiblemente con cada tipo de filtro se trabaja con diferentes filtros de banda estrecha.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** por cada conjunto de filtros se usa un filtro de excitación de banda estrecha y un filtro de bloqueo de banda estrecha.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** para la visualización de las células inmunocompetentes se trabaja con dos conjuntos de filtros, particularmente un conjunto de filtros con filtros de banda estrecha para isotiocianato de fluoresceína y un conjunto de filtros para filtros de banda estrecha para cianina 3.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** para la medición de las células inmunocompetentes se usan al menos dos moléculas de captura diferentes y al menos dos moléculas de detección diferentes, donde preferiblemente para la medición de las células inmunocompetentes se usan al menos dos moléculas de detección, que están marcadas respectivamente con uno de los colorantes.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** se mide el número de células inmunocompetentes, particularmente células T, preferiblemente células-T_{H1}, que segregan interferón- γ y Interleuquina-2.
- 45 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** para la incubación de las células eucarióticas se usa al menos antígeno específico de tuberculosis del grupo PPD, RD 1, RD 2, MPT 64, MTB 41 y PPE 44.
- 50 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** para la incubación de las células eucarióticas se utiliza al menos antígeno específico de borreliosis del grupo VlsE, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D y OSP E.
- 55 10. Uso del método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el control del estado infeccioso, especialmente para la distinción entre infecciones agudas por un lado e infecciones latentes o superadas por otra parte.
11. Uso del método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 hasta 9 para el pronóstico de vacunación.

Figura 1

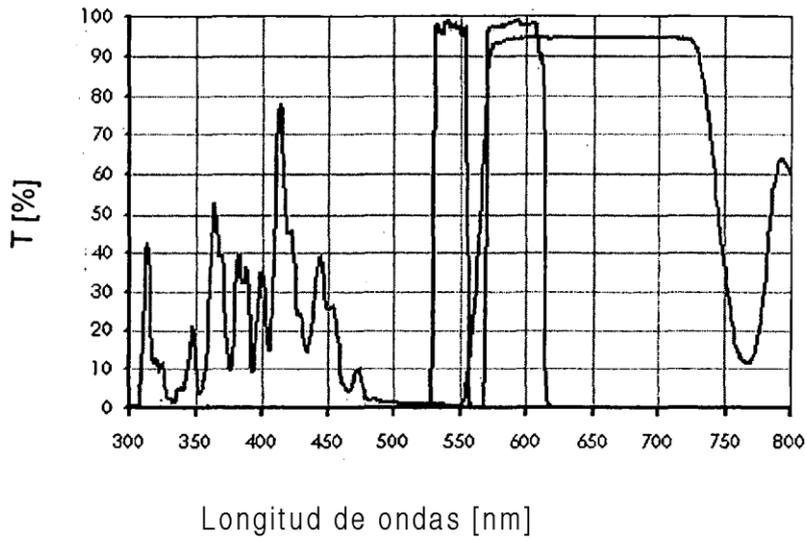


Figura 2

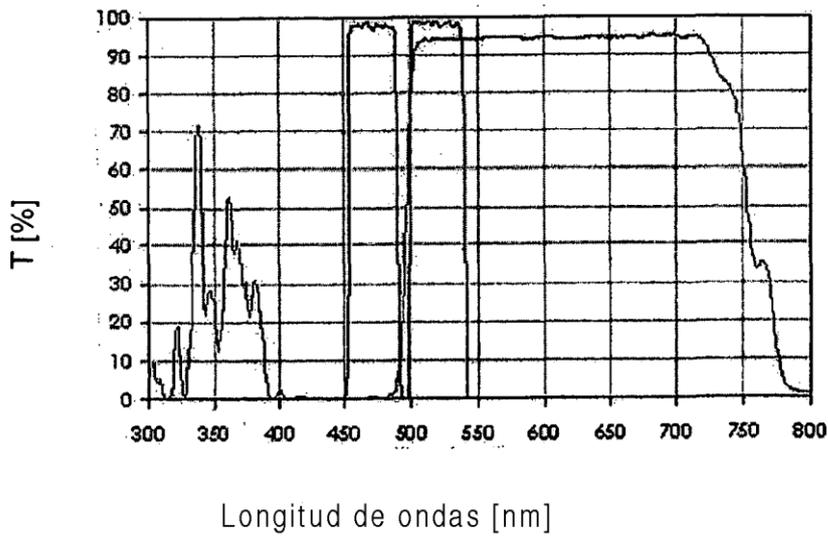


Figura 3

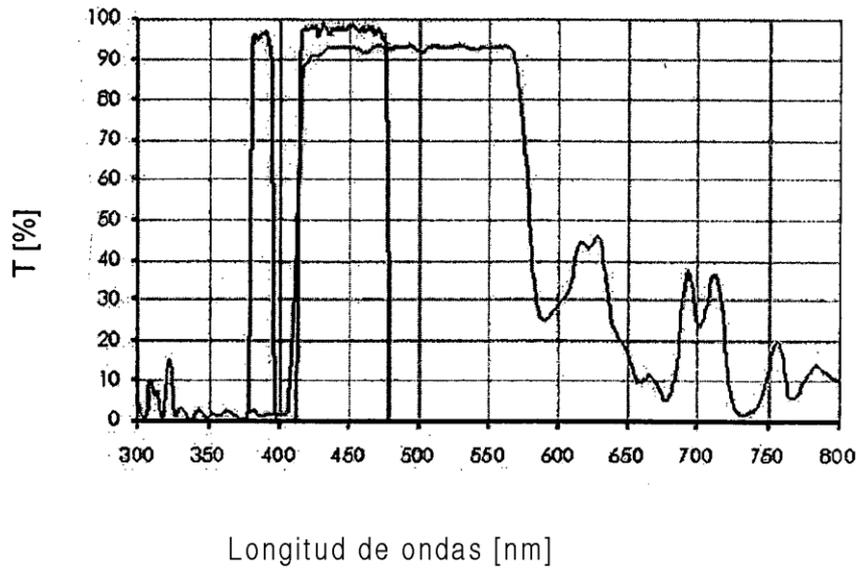


Figura 4

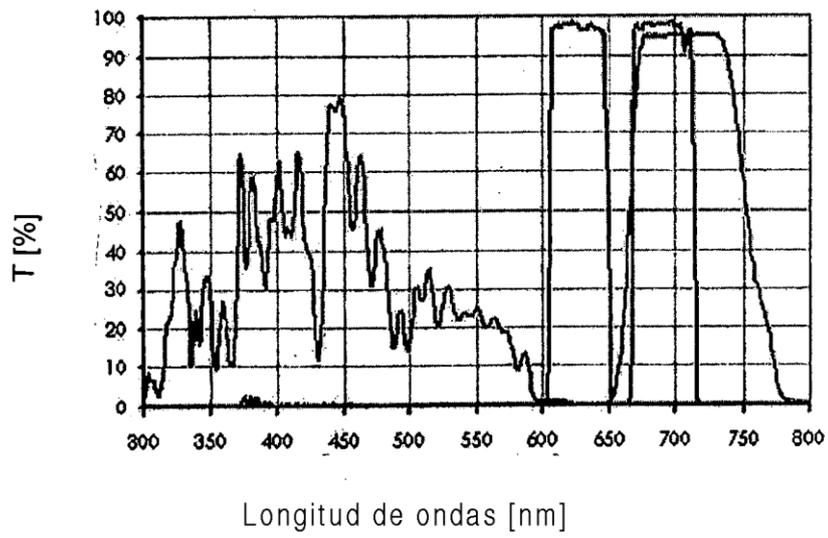


Figura 5

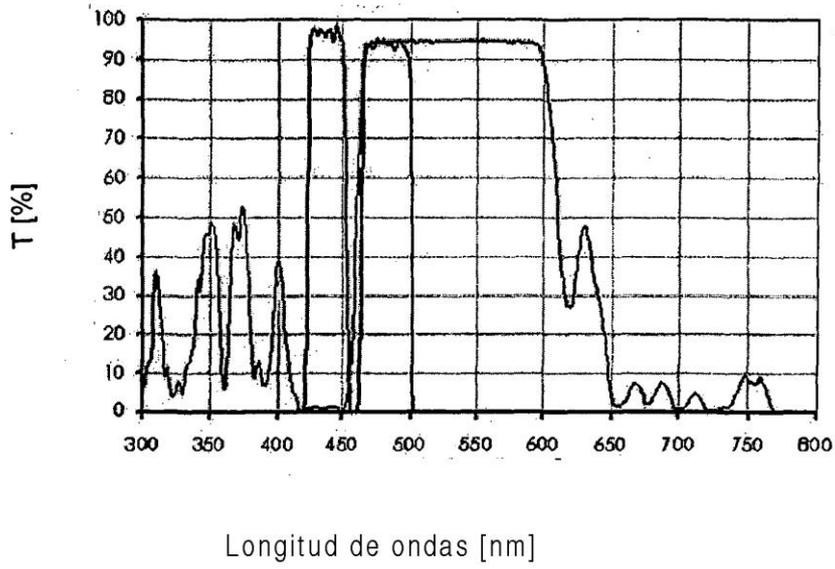


Figura 6

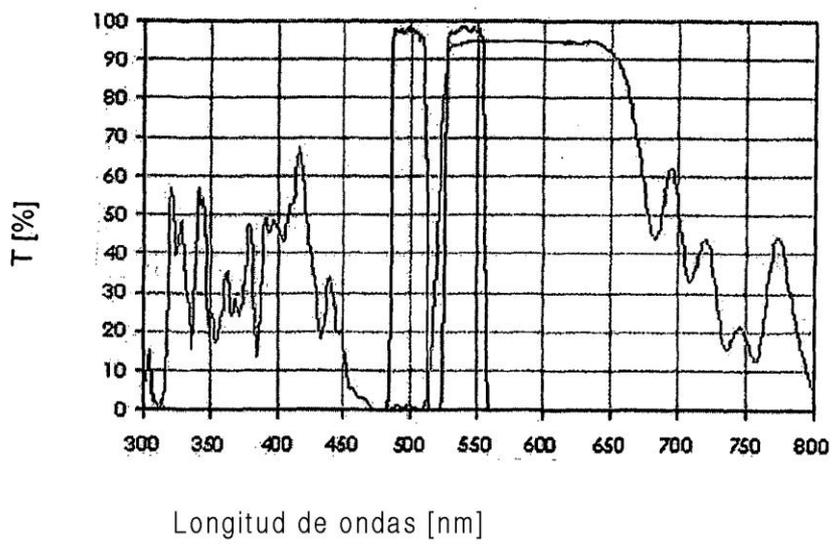


Figura 7

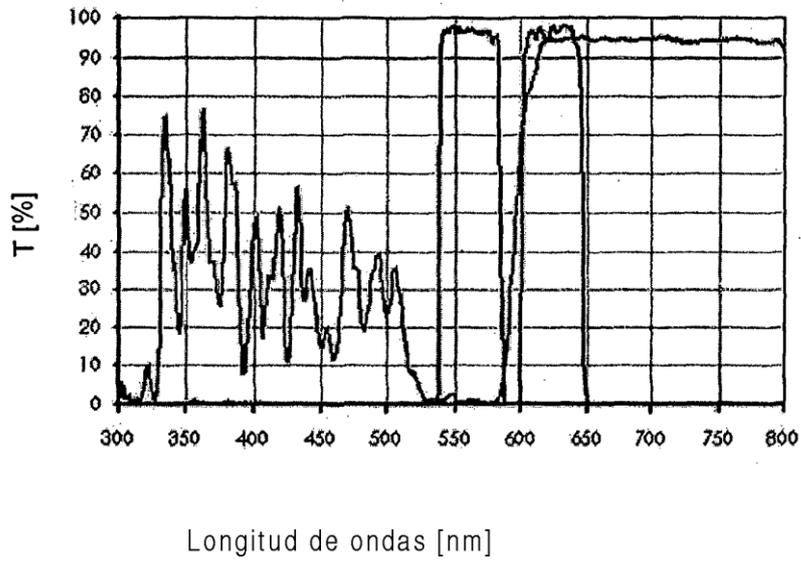


Figura 8

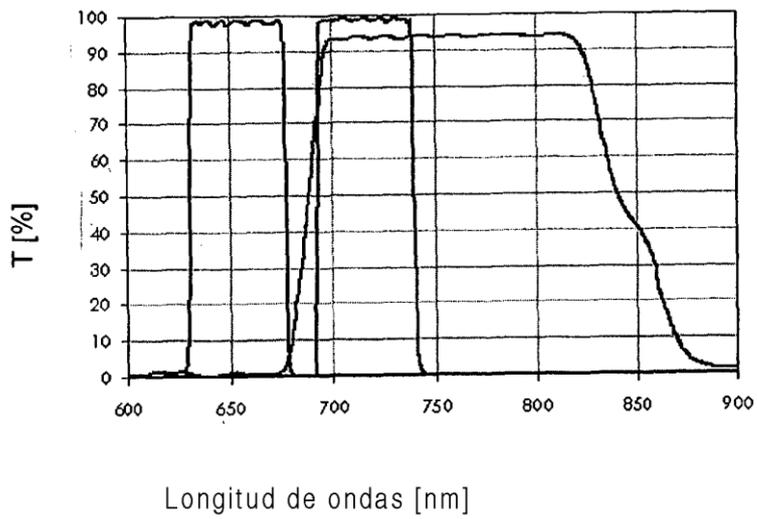


Figura 9

