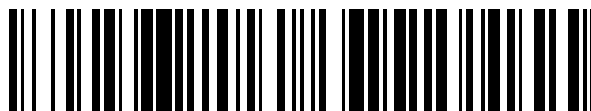


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 650**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2015** **PCT/FR2015/050353**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015** **WO15124851**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2015** **E 15706914 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 3108251**

54 Título: **Procedimiento y kit para determinar la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue grave**

30 Prioridad:

18.02.2014 FR 1451272

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

03.07.2018

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**BEDIN, FRÉDÉRIC y
FRAGNOUD, ROMAIN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 674 650 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y kit para determinar la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue grave

- 5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento para el pronóstico precoz del dengue grave o dengue hemorrágico utilizando unos marcadores proteicos.

10 Esos últimos 30 años, el dengue, una enfermedad viral transmitida por los mosquitos hematófagos urbanos del género *Aedes*, se ha extendido a través del mundo de manera preocupante. Actualmente es un verdadero problema de salud pública para más de un centenar de países situados en la zona subtropical, particularmente en las zonas del Pacífico Occidental, América del sur y Asia del Sureste. La emergencia de la enfermedad se debe en gran parte a la explosión demográfica y a la urbanización anárquica. Las anomalías climáticas tienen también un papel no insignificante.

15 En este sentido, el dengue podría emerger en las regiones occidentales del globo que hasta ahora se han librado del virus. Así, *Aedes albopictus*, uno de los vectores de la enfermedad, se ha encontrado recientemente en el norte de Italia y en el Sur de Francia. Últimamente, unos casos de dengue autóctonos se han señalado en el sur de Francia. Se estima que cerca de 3 mil millones de personas están expuestas a los riesgos del dengue. Cerca de un millón de hospitalizaciones se registran anualmente y los fallecimientos se cuentan por miles. Los niños son las principales víctimas de la enfermedad.

20 El virus del dengue es un virus recubierto de ARN monocatenario de polaridad positiva de la familia de los Flaviviridae. El genoma del virus (11000 nucleótidos) codifica una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos que sufre una escisión co- y post-traducciona que da como resultado proteínas estructuras (C, prM, E) y proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Existen 4 estereotipos virales (DV1 a DV4), que pueden coexistir en zonas endémicas. Existe aproximadamente un 70% de homología de secuencias entre los diferentes serotipos. La infección por un serotipo dado confiere una inmunidad a largo plazo para este serotipo. La protección cruzada dura sólo algunos meses: la reinfección es por lo tanto posible con un serotipo diferente.

30 La infestación empieza con la picadura del mosquito infectado por uno de los virus del dengue. La incubación, periodo durante el cual el virus se replica en la sangre sin por ello dar síntomas, dura generalmente de 4 a 10 días. Los primeros signos aparecen después del periodo de incubación.

35 En su forma clásica (fiebre de dengue "clásica" o *Dengue Fever*: DF), el dengue se caracteriza por una hipertermia de aparición brutal acompañada de uno o varios de los síntomas siguientes: escalofríos, cefaleas, dolores articulares y/o musculares, náuseas, vómitos. También puede producirse una erupción cutánea, generalmente hacia el quinto día de los síntomas. Esta fase febril aguda, que corresponde a la fase virémica, dura generalmente de 3 a 5 días (en casos extremos: 2 a 7 días). Más del 95% de los casos no presentarán ningún signo de gravedad y se curarán sin complicación en menos de 7 días.

45 En del 2 al 4% de los casos, el paciente puede desarrollar una fase crítica caracterizada por un síndrome de fuga plasmática más o menos grave y una elevación del hematocrito que conduce a un dengue hemorrágico (*Dengue Hemorrhagic Fever*: DHF). Esta fase aparece típicamente (pero no obligatoriamente) en el momento de la defervescencia térmica, alrededor del 4º o 5º día. Es generalmente breve (de 24 a 48h) pero puede evolucionar hacia una forma grave caracterizada por manifestaciones hemorrágicas importantes, un estado de shock y/o la falta de uno o varios órganos. Lo más frecuentemente, la evolución hacia una forma grave se anuncia por uno o más signos de alerta, tales como:

- 50 - fiebre (temperatura superior a 39°C) después del 5º día;
- dolores abdominales intensos, diarreas persistentes, vómitos incontrolables con rechazo total de alimentación;
- 55 - edemas y/o efusión menor;
- sangrados de las mucosas que no se detiene espontáneamente;
- agitación o letargo pronunciado;
- 60 - trombopenia;
- signos de hemoconcentración.

65 En los casos más graves, la fuga de plasma puede conllevar un shock hipovolémico mortal (*Dengue Shock Syndrome*: DSS) si el paciente no es tratado rápidamente. Padecimientos hepáticos y neurológicos, raros pero mortales, se asocian también con la severidad de la enfermedad. Variable según las epidemias, el porcentaje de

mortalidad puede alcanzar un 5% de los casos declarados de DHF. Este porcentaje puede aumentar hasta el 20% sin atención hospitalaria o tratamientos adecuados.

Por simplificación, estos casos graves se denominarán en lo que sigue de la descripción, por oposición a los dengues clásicos, DF. El 90% de los casos de dengues graves tienen lugar durante una infección secundaria por un serotipo heterólogo y el 10% durante una infección primaria, habitualmente en lactantes de 6 meses a 1 año. Existen varios factores que influyen en la gravedad de la infección, tales como los factores del hospedante, el serotipo y el genotipo del virus, el orden y el intervalo de sucesión de los virus infectantes, la calidad y la cantidad de anticuerpos a reacciones cruzadas y la respuesta CD4/CD8. Los estudios han mostrado una correlación entre la carga viral y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, aún no se conocen las causas exactas de la aparición del dengue grave. Hasta ahora, no se ha puesto en evidencia ningún determinante específico de la virulencia. Además, como no existen vacunas contra el virus del dengue, los únicos tratamientos disponibles son unos tratamientos sintomáticos. Por ello, es importante poder supervisar las epidemias y pronosticar los casos graves para una atención hospitalaria adecuado.

Los métodos actualmente utilizados para el diagnóstico del dengue no permiten pronosticar una evolución hacia un dengue grave. A lo sumo, los métodos serológicos permiten discriminar las infecciones primarias y secundarias y los métodos moleculares permiten detectar el virus y efectuar el serotipaje [1, 2, 3, 4].

El documento WO2013/148335 describe unos procedimientos y kit que permiten determinar si un sujeto padece una infección por el virus del dengue susceptible de evolucionar hacia una enfermedad del dengue eventualmente mortal. Se utilizan al menos dos biomarcadores y se seleccionan entre el factor de crecimiento del endotelio vascular, la quimasa 1 y la alfa2-macroglobulina.

La presente invención responde a las problemáticas presentadas anteriormente mediante un procedimiento que permite, al mismo tiempo, una detección precoz y específica de proteínas en una muestra sanguínea que permite pronosticar los pacientes que evolucionan hacia dengues graves. En efecto, los inventores han encontrado, de manera sorprendente, que las proteínas del hospedante se expresaban de manera más o menos abundante (sobreexpresadas/subexpresadas) en los casos de pacientes que evolucionan hacia dengues graves en comparación con su cantidad o expresión en los casos de pacientes que se mantienen con dengues clásicos (es decir que no evolucionan hacia dengues graves) en unas muestras sanguíneas constituidas, por ejemplo, por el plasma. Muy particularmente, han mostrado por primera vez y de manera totalmente inesperada que la olfactomedina-4 (OLFM4) está sobreexpresada en el caso de pacientes que evolucionan hacia dengues graves y constituye por lo tanto un marcador para pronosticar el dengue grave.

Asimismo, la presente invención tiene por objeto un procedimiento para pronosticar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue grave, en el que:

a) se determina la cantidad de al menos un marcador que es la olfactomedina 4 en dicha muestra sanguínea,

b) se compara la cantidad de la olfactomedina 4 determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia de dicho marcador obtenido a partir de un grupo de individuos que han sido diagnosticados de padecer dengue no grave, en el que si la cantidad de olfactomedina 4 determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se pronostica que el paciente evolucionará hacia un dengue grave.

Según el procedimiento de la invención, se puede también determinar en la etapa a) la cantidad de al menos otro marcador seleccionado entre el factor plaquetario 4 y la α 2-macroglobulina o la cantidad respectiva de los dos marcadores en la muestra sanguínea, y en la etapa b) se compara la cantidad del marcador o de los dos marcadores de la etapa a) con una cantidad de referencia obtenida a partir de un grupo de individuos que han sido diagnosticados de padecer dengue no grave y si la cantidad del factor plaquetario 4 y/o de la α 2-macroglobulina determinada en la etapa a) es inferior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se determina que el paciente evolucionará hacia un dengue grave.

La invención tiene también por objeto la utilización de la olfactomedina como marcador proteico para determinar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad para un paciente de evolucionar hacia un dengue grave.

La invención se refiere también a unos kits para determinar, *in vitro*, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue grave, tales como se definen en las reivindicaciones 7-9.

El kit puede además comprender una pareja de unión del Platelet Factor 4 (PF4) y/o una pareja de unión de la proteína NS1 del virus del dengue.

Definiciones

Por muestra sanguínea, se entiende la sangre entera, el suero y el plasma.

Por un grupo de individuos que han sido diagnosticados de padecer dengue no grave, utilizado para determinar la cantidad de referencia del marcador de interés, se entiende, por supuesto, que el grupo de individuo no ha evolucionado hacia un dengue grave. Asimismo, la comparación en la etapa b) de la cantidad de platelet factor 4 determinada en la etapa a) se realiza con una cantidad de referencia de dicho marcador obtenido a partir de un grupo de individuos que padecen dengue, pero que no han evolucionado hacia un dengue grave.

Por pareja de unión se entiende por ejemplo los receptores, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, los análogos de anticuerpos y cualquier otro ligando capaz de unirse a una proteína.

Los anticuerpos parejas de unión son, por ejemplo, o bien unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales pueden ser obtenidos por inmunización de un animal con el inmunógeno apropiado, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los demás constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

En primer lugar, se inmuniza un animal, generalmente un ratón con el inmunógeno apropiado, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra este antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos son después fusionados con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente a la proteína podrán ser ensayadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia (transferencia western) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un bisensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son a continuación purificados, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser también unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

Por "análogos de anticuerpos" se entienden unos compuestos biológicos y/o químicos que poseen las mismas capacidades de unión que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o unas capacidades de unión similares. En particular, los análogos de anticuerpos incluyen pequeñas proteínas que, como los anticuerpos son capaces de unirse a una diana biológica que permite así detectarla, capturar o simplemente determinarla dentro de un organismo o de una muestra biológica. Los campos de aplicaciones de estos análogos de anticuerpos son prácticamente tan amplios como los de los anticuerpos. A título de ejemplo, se pueden citar las Nanofitines™, pequeñas proteínas comercializadas por la compañía AFFILOGIC.

Las parejas de unión específicas de la proteína buscada pueden ser utilizadas como reactivo de captura, como reactivo de detección o como reactivos de captura y de detección.

La visualización de las reacciones inmunológicas, es decir de la unión proteína/pareja de la unión, se pueden efectuar mediante cualquier medio de detección por medio de un marcado, de la pareja de unión.

Por marcado, se entiende la fijación de un reactivo marcador capaz de generar una señal detectable, es decir un compuesto, una sustancia o una partícula que puede ser detectada por medios visuales, fluorescentes, instrumentales.

Una lista no limitativa de estos reactivos marcadores consiste en:

- las partículas metálicas o de aleaciones, tales como las partículas de oro coloidal,
- las partículas de polímero, tales como las partículas de látex colorados,
- las partículas magnéticas,
- las moléculas fluorescentes,
- las moléculas quimioluminiscentes.

A título de ejemplo de ensayos inmunológicos tales como se ha definido anteriormente, se pueden citar los métodos "sándwich" y de "competición".

Figuras:

La mayoría de las figuras ilustran la validación de los resultados mediante un ensayo ELISA cuantitativo efectuado en muestras individuales de pacientes extraídas durante la fase febril aguda de la enfermedad, antes de la defervescencia. Los pacientes que se mantenían con dengue clásico se marcan con DF y los pacientes que han evolucionado después hacia un dengue grave se marcan con DS. En todos los casos, la lectura se efectúa a una densidad óptica (DO) de 450 nm. Los resultados se han obtenido sobre muestras de origen geográfico diferente: Colombia y Camboya. En los gráficos obtenidos (programa GraphPad Prism V4.03), la media calculada se representa por una línea horizontal. El cuadro ilustra los valores que abarcan el 50% de los individuos. Se ilustran también los valores máximo y mínimo. Los valores tenidos en cuenta corresponden a la media de dos ensayos independientes efectuados en duplicado.

La figura 1 ilustra la presencia de virus en las fracciones purificadas a partir del plasma de pacientes, pero no en el control (C), puesto en evidencia con una transferencia western utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína viral E.

La figura 2 ilustra los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo por ensayo ELISA del marcador OLFM4 sobre muestras de plasma que provienen de pacientes colombianos.

La figura 3 ilustra los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo por ensayo ELISA del marcador OLFM4 sobre muestras de plasma que provienen de pacientes camboyanos.

La figura 4 ilustra los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo por ensayo ELISA del marcador PF4 sobre muestras de plasma que provienen de pacientes colombianos.

La figura 5 ilustra los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo por ensayo ELISA del marcador PF4 sobre muestras de plasma que provienen de pacientes camboyanos.

La figura 6 ilustra los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo por ensayo ELISA del marcador A2M sobre muestras de plasma que provienen de pacientes camboyanos.

Ejemplo 1: Caracterización de las muestras

Se han seleccionado 15 muestras de plasma colombiano positivas para el dengue, entre las cuales 8 proceden de pacientes que se mantenían con dengue clásico sin evolucionar hacia un dengue grave (pacientes/muestras denominados a continuación DF o dengue clásico) y 7 proceden de pacientes que han desarrollado después un dengue grave (pacientes/muestras denominados a continuación DS o dengue grave). Se agruparon los diferentes plasmas, que constituyen respectivamente un pool de plasma dengue clásico DF y un pool de plasma dengue grave DS para los que han evolucionado hacia un dengue grave. Todos los plasmas se extrajeron durante la fase febril aguda de la enfermedad, antes de la fase crítica, de unos enfermos que tienen una infección secundaria. Los serotipos en cuestión eran los serotipos 1, 2 y 3. Todos los pacientes que han desarrollado un dengue grave estaban hospitalizados y presentaban síntomas de hemorragias. No se ha informado de ninguna comorbilidad [5]. Todos los plasmas se verificaron como NS1-positivos (Kit Platelia Dengue Biorad) y la carga viral se verificó también en Q-RTPCR mediante un kit comercial (PrimerDesign) siguiendo las instrucciones del proveedor: el número medio de copias de ARN viral se estimó a 4.10^6 y $4,1 \cdot 10^7$ para los pools dengue clásico (DF) y dengue grave (DS), respectivamente. Los pools constituidos corresponden a un volumen de aproximadamente 2 ml de plasma. Antes de la purificación, las mezclas de plasma se centrifugaron 5 min a 1000g y a 4°C, a fin de quitar las impurezas presentes en la muestra y obtener unas muestras clarificadas.

Los criterios de selección de los plasmas se describen en la tabla 1 siguiente. Las extracciones se efectuaron después de la aparición de los síntomas.

Tabla 1

Plasma colombiano		POOL DF	POOL DS
General	Nombre	8	7
	Edad (Media)	26,8	33,7
	Relación M/F	6/2	3/4
	Día	3,3	2,7
	Infección secundaria	Si	Si
	NS1	Positivo	Positivo
Serotipo	DV1	1	0
	DV2	1	3
	DV3	6	4

Estos pools de muestras de plasma se han purificado después para obtener fracciones enriquecidas de virus como se describe a continuación.

Ejemplo 2: Purificación de las muestras

Todas las etapas se efectúan a 4°C. Las muestras clarificadas se complementan con 8 ml de PBS frío a pH 8 (PBS8), después se centrifugan 2h a 41 000 g en una ultracentrifugadora OptimaL90 (Beckman). El rotor utilizado es el rotor SW41 (Beckman). Después de la centrifugación, se retira el sobrenadante y el residuo viral obtenido se resuspende en 200 microlitros de PBS8, y después se carga sobre un gradiente discontinuo constituido de 5 ml de sacarosa al 60% (p/p) en PBS8 y 5 ml de sacarosa al 20% (p/p) en PBS8. Después de una nueva centrifugación de 2h a 41 000 g, se extrae con una pipeta un anillo enriquecido en viriones, localizado en la interfaz entre las dos soluciones de sacarosa, se diluye 10 veces por PBS8 y finalmente se centrifuga una última vez 2h a 41 000 g. El residuo obtenido se resuspende en 200 microlitros de PBS8.

Esta resuspensión se purifica después mediante la utilización de un polielectrolito insoluble, el Viraffinity (BioSupportGroup, USA). Para ello, se añaden 200 microlitros de tampón MN (60 mM MES pH6.5, 150 mM NaCl) a la suspensión viral, así como 100 microlitros de Viraffinity. Se incuba la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente y después se centrifuga 10 min a 1000g, según las instrucciones del proveedor. El sobrenadante se retira y el residuo de polímero se aclara 3 veces con 200 microlitros de tampón MN. Las proteínas virales se recuperan por calentamiento del polímero 5 min./70°C en presencia de 50 microlitros de un tampón que contiene SDS (Novex InVitrogen) después de una centrifugación de 5 min. a 1000 g.

La presencia del virus en las muestras finales se verificó por inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de envoltura del virus del dengue (proteína E). Como se ilustra en la figura 1, se detectan específicamente por el anticuerpo monoclonal en los pools de plasma fuertes señales a 60 KDa y 120 KDa, que corresponden respectivamente a las formas monoméricas y diméricas de la proteína de envoltura,. Por el contrario, la proteína de envoltura no se detectó sobre un control que corresponde a un pool de plasma sano (sin dengue) purificado de la misma manera que la descrita anteriormente.

Ejemplo 3: Identificación de las proteínas específicas de cada pool de plasma dengue clásico DF y dengue grave DS por espectrometría de masa (MS)

Método:

Las preparaciones virales y la muestra control obtenida según el ejemplo 2 se depositan sobre un gel de poliacrilamida no desnaturizante, y se hacen migrar hasta que las proteínas entren en el interior del gel, esto con el fin de desalar la muestra. La banda que contiene las proteínas se escinde manualmente y después se lava 3 veces en un tampón que contiene un 50% de acetonitrilo para finalmente secarse en un 100% de acetonitrilo. El gel se rehidrata después en una solución al 7% de H₂O₂ antes de lavarse de nuevo. Una solución de tripsina diluida en 25 mM NH₄HCO₃ se añade después para una hidrólisis a 37°C durante la noche. Los péptidos así obtenidos se extraen mediante unas extracciones secuenciales de 15 minutos con 30 microlitros de acetonitrilo al 50%, 30 microlitros de ácido fórmico al 5% y 30 microlitros de acetonitrilo al 100%. Estas extracciones secuenciales se mezclan, se secan al vacío y se resuspenden en una solución que contiene un 5% de acetonitrilo y un 0,1% de ácido trifluoroacético. Después de la cuantificación de las muestras, se analiza una cantidad definida de péptidos mediante cromatografía nanolíquida acoplada en tándem con espectrometría de masas (Ultimate 3000, Dionex y LTQ-Orbitrap VelosPro, Thermo Fisher Scientific). Los resultados se adquieren gracias al programa Xcalibur (ThermoFisher) y se transforman automáticamente por el programa Mascot Daemon V2.2 (Matrix Science). La búsqueda se lleva a cabo después en bases de datos Swissprot y Trembl a través de Mascot2.2. Cada experimento se lleva a cabo dos veces, de manera independiente. La identificación de las proteínas se realizó por el laboratorio EDYP Service (CEA Grenoble, Francia).

Resultados:

La proteína viral de envoltura E se identificó de manera repetida en las muestras que contienen el virus. La secuencia del péptido mayoritariamente identificada es GWGNGCGLLFKG. Este resultado confirma la presencia del virus en la fracción purificada.

Para las proteínas de origen celular, identificadas por proteómica sobre los pools de plasmas purificados, los resultados obtenidos se resumen en las tablas 2a y 2b. En estas tablas, sólo se han considerado las proteínas que tienen una varianza inferior al 25% para el número de péptidos encontrados de un experimento al otro. Igualmente, para la muestra dengue grave, se requirieron un número de péptidos superior a 2. Siguiendo estos criterios, se han seleccionado 189 proteínas finalmente. Estas proteínas se describen en las tablas 2a y 2b siguientes. Una relación "número de péptidos muestra dengue grave (DS)" / "número de péptidos muestra dengue clásico (DF)" (DS/DF) ha podido calcularse para la mayoría de estas proteínas (véase la tabla 2a). Algunas proteínas se identificaron únicamente en la muestra DS (véase la tabla 2b), en este caso la relación DS/DF no era calculable.

Tabla 2a

Número de acceso	Nombre de la proteína	Número medio de péptidos DF	Número medio de péptidos DS	Relación péptidos DS/DF
P09871	Complement C1s subcomponent (C1 esterase)	3,5	14,5	4,14
P07225	Vitamin K-dependent protein S	1	4	4,00
P01008	Antithrombin-III (ATIII) (Serpín C1)	3	9,5	3,17
Q16610	Extracellular matrix protein 1 (Secretory component p85)	1	3	3,00
P27918	Properdin (Complement factor P)	1,5	4	2,67
B4E1B2	Serotransferrin	11	29	2,64
Q53H26	Transferrin variant (Fragment)	11	29	2,64
B4DPQ0	Complement C1r subcomponent	5	13	2,60
P01019	Angiotensinogen (Serpín A8)	1	2,5	2,50
B4DDU2	Tubulin alpha-ubiquitous chain	2,5	6	2,40
P01779	Ig heavy chain V-III region TUR	2,5	6	2,40
P68366	Tubulin alpha-4A chain (Alpha-tubulin 1)	3	6,5	2,17
P00734	Prothrombin (Coagulation factor II)	2	4	2,00
P21333	Filamin-A (Actin-binding protein 280)	14,5	28,5	1,97
P00450	Ceruloplasmin (EC 1.16.3.1) (Ferroxidase)	8,5	16,5	1,94
E7EX29	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment)	4,5	8,5	1,89
P63104	14-3-3 protein zeta/delta (KCIP-1)	4,5	8,5	1,89
B4E1D8	cDNA FLJ51597, highly similar to C4b-binding protein	10,5	19	1,81
P18206	Vinculin (Metavinculin)	5	9	1,80
P12814	Alpha-actinin-1 (Alpha-actinin cytoskeletal isoform)	6,5	11,5	1,77
043707	Alpha-actinin-4 (F-actin cross-linking protein)	6,5	11,5	1,77
P06396	Gelsolin (AGEL) (Actin-depolymerizing factor)	3,5	6	1,71
P05106	Integrin beta-3 (Platelet membrane glycoprotein IIIa) (GPIIIa)	5,5	9	1,64
P08514	Integrin alpha-IIb (GPIIb) (Platelet membrane glycoprotein IIb)	12,5	20	1,60
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor (PIgR)	2,5	4	1,60
Q9Y490	Talin-1	28,5	43	1,51
A2J1N9	Rheumatoid factor RF-ET12 (Fragment)	3	4,5	1,50
Q5NV90	V2-17 protein (Fragment)	3	4,5	1,50
P01023	Alpha-2-macroglobulin (Alpha-2-M)	56,5	83	1,47
A2KBC6	Anti-FactorVIII scFv (Fragment)	6,5	9,5	1,46
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin (ACT) (Serpín A3)	3,5	5	1,43
P00738	Haptoglobin	13,5	19	1,41
P02743	Serum amyloid P-component (SAP)	2,5	3,5	1,40
P01024	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 1	60,5	84,5	1,40
A8K008	cDNA FLJ78387	17,5	24	1,37
A2IPI5	HRV Fab 026-VL (Fragment)	3	4	1,33
Q6UX06	Olfactomedin-4 (OLM4) (Antiapoptotic protein GW112)	4,5	6	1,33
P03952	Plasma kallikrein (EC 3.4.21.34) (Fletcher factor)	1,5	2	1,33
P08567	Pleckstrin (Platelet 47 kDa protein) (p47)	1,5	2	1,33
P07996	Thrombospondin-1	19,5	26	1,33
P07437	Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain)	4,5	6	1,33
A2MYD4	V2-7 protein (Fragment)	3	4	1,33
P00488	Coagulation factor XIII A chain (EC 2.3.2.13)	3,5	4,5	1,29
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain (Alpha-tubulin 3)	3,5	4,5	1,29
P68363	Tubulin alpha-1B chain (Alpha-tubulin ubiquitous)	3,5	4,5	1,29

ES 2 674 650 T3

Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain (Alpha-tubulin 6)	3,5	4,5	1,29
Q9H4B7	Tubulin beta-1 chain	3,5	4,5	1,29
Q96K68	cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080	12	15	1,25
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	2	2,5	1,25
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	2	2,5	1,25
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	2,5	1,25
Q6N089	Putative uncharacterized protein DKFZp686P15220	15	18,5	1,23
P02675	Fibrinogen beta chain	11	13,5	1,23
P00739	Haptoglobin-related protein	12	14,5	1,21
Q86UX7	Fermitin family homolog 3 (Kindlin-3)	5	6	1,20
P02751	Fibronectin (FN)	61,5	72,5	1,18
B7ZLE5	FN1 protein	61,5	72,5	1,18
Q6MZM7	Putative uncharacterized protein DKFZp686O12165	61,5	72,5	1,18
Q68CX6	Putative uncharacterized protein DKFZp686O13149	61,5	72,5	1,18
P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	8,5	10	1,18
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 (Kappa-actin)	8,5	10	1,18
P0C0L4	Complement C4-A (Acidic complement C4)	52	61	1,17
P0C0L5	Complement C4-B (Basic complement C4)	52	61	1,17
B0UZ85	Complement component 4B (Childo blood group)	53	62	1,17
Q6MZQ6	Putative uncharacterized protein DKFZp686G11190	15	17,5	1,17
P07477	Trypsin-1 (EC 3.4.21.4) (Serine protease 1)	3	3,5	1,17
Q4TZM4	Hemoglobin beta chain (Fragment)	6,5	7,5	1,15
P04004	Vitronectin (VN) (S-protein) (V75)	6,5	7,5	1,15
B2RUT6	Complement component 4A (Rodgers blood group)	53,5	61,5	1,15
P01031	Complement C5	3,5	4	1,14
Q9UL78	Myosin-reactive immunoglobulin light chain variable region	3,5	4	1,14
Q5NV62	V3-4 protein (Fragment)	6	7	1,17
A6H8M8	C4A protein (Complement C4 gamma chain)	53,5	61	1,14
P02768	Serum albumin	51,5	58,5	1,14
Q7Z351	Putative uncharacterized protein DKFZp686N02209	15	17	1,13
P02649	Apolipoprotein E (Apo-E)	4	4,5	1,13
P01009	Alpha-1-antitrypsin (Alpha-1 protease inhibitor) (Serp1 A1)	8,5	9,5	1,12
Q08380	Galectin-3-binding protein (Basement membrane autoantigen p105)	12	13	1,08
Q6N092	Putative uncharacterized protein DKFZp686K18196 (Fragment)	12	13	1,08
P63261	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	20	21,5	1,08
P02671	Fibrinogen alpha chain	9,5	10	1,05
P60709	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	19,5	20,5	1,05
A2MYE1	A30 (Fragment)	4	4	1,00
Q96SA9	Anti-streptococcal/anti-myosin immunoglobulin kappa light chain	3,5	3,5	1,00
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (EC 3.6.3.14)	2	2	1,00
O43866	CD5 antigen-like (CT-2) (IgM-associated peptide)	15	15	1,00
P12259	Coagulation factor V (Activated protein C cofactor)	1,5	1,5	1,00
P02747	Complement C1q subcomponent subunit C	5,5	5,5	1,00
P04196	Histidine-rich glycoprotein (HPRG)	1,5	1,5	1,00
P01892	HLA class I , A-2 alpha chain (MHC class I antigen A*2)	3	3	1,00
P30447	HLA class I histocompatibility antigen, A-23	3	3	1,00

ES 2 674 650 T3

	alpha chain			
F6IQP2	MHC class I antigen (Fragment)	3	3	1,00
F6IR35	MHC class I antigen (Fragment)	3	3	1,00
A2NKM7	NANUC-2 heavy chain (Fragment)	3	3	1,00
P26022	Pentraxin-related protein PTX3 (Pentaxin-related protein PTX3)	2	2	1,00
P02760	Protein AMBP	2,5	2,5	1,00
A2J1M8	Rheumatoid factor RF-IP12 (Rheumatoid factor RF-IP13)	3	3	1,00
A2J1N0	Rheumatoid factor RF-IP14 (Fragment)	6	6	1,00
Q9HCC1	Single chain Fv (Fragment)	7,5	7,5	1,00
H0YLA9	Uncharacterized protein	2	2	1,00
P02774	Vitamin D-binding protein (DBP) (VDB)	2	2	1,00
P02647	Apolipoprotein A-I (ApoA-I) (Apolipoprotein A1)	11	10,5	0,95
P68871	Hemoglobin subunit beta (Beta-globin)	8,5	8	0,94
A2NYQ9	Anti-folate binding protein (Fragment)	7	6,5	0,93
A2JA14	Anti-mucin1 heavy chain variable region (Fragment)	6,5	6	0,92
B6EDE2	Epididymis luminal protein 180 (Fragment)	6,5	6	0,92
Q14477	Hbbm fused globin protein (Fragment)	6,5	6	0,92
Q670S4	Hemoglobin Lepore-Baltimore (Fragment)	6,5	6	0,92
P02042	Hemoglobin subunit delta (Delta-globin)	6,5	6	0,92
Q9UL90	Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region	6,5	6	0,92
A2NZ55	Variable immunoglobulin anti-estradiol heavy chain	6,5	6	0,92
Q15485	Ficolin-2 (37 kDa elastin-binding protein)	5,5	5	0,91
Q9UL88	Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region	5	4,5	0,90
Q6ZVX0	cDNA FLJ41981 fis, clone SMINT2011888	9,5	8,5	0,89
Q7Z374	Putative uncharacterized protein DKFZp686C02218	9,5	8,5	0,89
Q6MZX9	Putative uncharacterized protein DKFZp686M08189	9,5	8,5	0,89
P02679	Fibrinogen gamma chain	12,5	11	0,88
Q6P5S8	antioxidant activity; very-low-density lipoprotein particle remodeling	16	14	0,88
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein (Stomatin)	4	3,5	0,88
P69905	Hemoglobin subunit alpha (Alpha-globin)	4	3,5	0,88
Q6GMX0	Putative uncharacterized protein	16	14	0,88
P02792	Ferritin light chain (Ferritin L subunit)	3,5	3	0,86
Q9UL71	Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region	7	6	0,86
Q07954	Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1)	7	6	0,86
A1A508	PRSS3 protein	3,5	3	0,86
Q6P5S3	Putative uncharacterized protein	7	6	0,86
Q65ZC9	Single-chain Fv (Fragment)	7	6	0,86
Q5CZ94	Putative uncharacterized protein DKFZp781M0386	6,5	5,5	0,85
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 (ITI-HC2)	9,5	8	0,84
Q16195	Keratin (Fragment)	9,5	8	0,84
P30464	HLA class I , B-15 alpha chain (MHC class I antigen B*15)	3	2,5	0,83
P03989	HLA class I , B-27 alpha chain (MHC class I antigen B*27)	3	2,5	0,83
Q9UL83	Myosin-reactive immunoglobulin light chain variable region	3	2,5	0,83
P35579	Myosin-9 (Myosin heavy chain 9)	8,5	7	0,82
A0A5E4	Putative uncharacterized protein	8,5	7	0,82
P10909	Clusterin (Apolipoprotein J) (Apo-J)	5,5	4,5	0,82

ES 2 674 650 T3

Q5EFE6	Anti-RhD monoclonal T125 kappa light chain	16	13	0,81
Q86TT1	Full-length cDNA clone CS0DD006YL02 of Neuroblastoma	28	22,5	0,80
O14791	Apolipoprotein L1 (ApoL-I)	2,5	2	0,80
A2NB45	Cold agglutinin FS-1 L-chain (Fragment)	2,5	2	0,80
A2NB44	Cold agglutinin FS-2 H-chain (Fragment)	2,5	2	0,80
B1N7B8	Cryocrystalglobulin CC1 kappa light chain variable region	2,5	2	0,80
Q86SX2	Full-length cDNA clone CS0DL004YM19 of B cells	2,5	2	0,80
Q7Z3Y6	Rearranged VH4-34 V gene segment (Fragment)	2,5	2	0,80
A0N5G5	Rheumatoid factor D5 light chain (Fragment)	2,5	2	0,80
H0YK52	Uncharacterized protein	2,5	2	0,80
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITI-HC4)	16	12,5	0,78
P31946	14-3-3 protein beta/alpha (KCIP-1)	4,5	3,5	0,78
P62258	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	4,5	3,5	0,78
Q04917	14-3-3 protein eta (Protein AS1)	4,5	3,5	0,78
P61981	14-3-3 protein gamma (KCIP-1)	4,5	3,5	0,78
P27348	14-3-3 protein theta (Protein HS1)	4,5	3,5	0,78
A2NUT2	Lambda-chain (AA -20 to 215)	9	7	0,78
P02776	Platelet factor 4 (PF-4)	4	3	0,75
P10720	Platelet factor 4 variant (CXCL4L1)	4	3	0,75
P02746	Complement C1q subcomponent subunit B	9,5	7	0,74
P48740	Mannan-binding lectin serine protease 1 (EC 3.4.21.-)	7,5	5,5	0,73
Q96JD0	Amyloid lambda 6 light chain variable region SAR (Fragment)	9	6,5	0,72
Q6GMV8	Putative uncharacterized protein	9	6,5	0,72
Q8NEJ1	Putative uncharacterized protein	9	6,5	0,72
A0N5G3	Rheumatoid factor G9 light chain (Fragment)	9	6,5	0,72
P02745	Complement C1q subcomponent subunit A	3,5	2,5	0,71
P60660	Myosin light polypeptide 6 (MLC-3)	3,5	2,5	0,71
Q6MZU6	Putative uncharacterized protein DKFZp686C15213	17,5	12,5	0,71
Q6N093	Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)	17,5	12,5	0,71
P61224	Ras-related protein Rap-1b (GTP-binding protein smg p21B)	3	2	0,67
P19105	Myosin regulatory light chain 12A (MLC-2B)	4	2,5	0,63
P05387	60S acidic ribosomal protein P2 (Renal carcinoma antigen NY-REN-44)	2,5	1,5	0,60
P19338	Nucleolin (Protein C23)	10	6	0,60
O75636	Ficolin-3 (Collagen/fibrinogen domain-containing lectin 3 p35)	3,5	2	0,57
F8VWA4	Uncharacterized protein	3,5	2	0,57
B7Z539	cDNA FLJ56954	8	4,5	0,56
Q96CX2	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12 (Pfetin)	4,5	2,5	0,56
P02730	Band 3 anion transport protein(AE 1)	17,5	9,5	0,54
P23528	Cofilin-1 (p18)	3	1,5	0,50
P06748	Nucleophosmin (NPM)	3	1,5	0,50
Q6N091	Putative uncharacterized protein DKFZp686C02220	7	3,5	0,50
Q6N041	Putative uncharacterized protein DKFZp686O16217 (Fragment)	7	3,5	0,50
P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	2	1	0,50
P04275	von Willebrand antigen 2	61,5	28,5	0,46
P62805	Histone H4	2,5	1	0,40

Q13201	Multimerin-1 (EMILIN-4)	11	4	0,36
B7Z1F8	cDNA FLJ53025, highly similar to Complement C4-B	52	16	0,31
P04114	Apolipoprotein B-100 (Apo B-100)	25	7,5	0,30
Q8TCG3	TPMsk3 (Fragment)	5	1,5	0,30
P16452	Erythrocyte membrane protein band 4.2 (P4.2)	5,5	1	0,18
P11277	Spectrin beta chain, erythrocyte (Beta-I spectrin)	23	3	0,13
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocyte (Erythroid alpha-spectrin)	33	1,5	0,05

Tabla 2b

Número de acceso	Nombre de la proteína	Número medio de péptidos DS
P00751	Complement factor B (C3/C5 convertase)	4,5
P00752	Complement component C8 alpha chain	2
P00753	Peroxiredoxin-1 (Natural killer cell-enhancing factor A)	2
P00754	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	2
P00755	Chloride intracellular channel protein 1	2
P00756	Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit)	2

Ejemplo 4: ELISA de confirmación

5

Método:

10 A fin de confirmar los resultados de espectrometría de masas, se han efectuado unos ELISA cuantitativos específicos por duplicado sobre plasmas individuales. Las proteínas seleccionadas y ensayadas, entre las identificadas en las tablas 2a/2b, son las que presentaban una relación dengue grave (DS)/dengue clásico (DF) superior o igual a 1,33 e inferior o igual a 0,75 con un número medio de péptidos superior a 1 para cada muestra y una relación potencial con la patología del dengue. Este primer cribado ha permitido ensayar sólo las proteínas que presentan más interés. Según estos criterios, se han seleccionado las proteínas siguientes:

- 15 - la ceruloplasmina,
- la proteína S,
- 20 - el complemento factor properdina,
- la antitrombina III,
- el componente de segregación p85,
- 25 - la proteína del complemento C1r,
- la proteína del complemento C1s,
- 30 - la angiotensina,
- el factor II,
- el CFB,
- 35 - el anti-factor VIII,
- el suero amiloide P-componente,
- 40 - la olfactomedina 4 (OLFM4),
- la trombospondina,
- el factor plaquetario 4 (PF4),
- 45 - la proteína del complemento C1q,

- la moesina, y

- la proteína del complemento C8.

5 Se ensayaron también la multimerina-1, la apolipoproteína B-100 y el factor von Willebrand.

Conviene señalar que estas proteínas son mayoritariamente unos elementos de la vía de coagulación o de la cascada del complemento.

10 Estos ELISA se efectúan gracias a unos kits comerciales (USCN China), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los análisis estadísticos (ensayo de Man-Whitney y curva de ROC/AUC) se efectuaron con la ayuda del programa GraphPad Prism V4.03.

15 Cada marcador candidato se ensayó sobre unas muestras de plasma individuales. Estas muestras son unas muestras de plasma extraídos durante la fase febril aguda de la enfermedad (fase virémica), proviniendo estas muestras o bien de pacientes que se han mantenido con dengue clásico DF, sin evolucionar hacia dengue grave, o bien de pacientes que han evolucionado hacia dengue grave DS. Todos los pacientes tenían un dengue secundario. Sólo estaban representados los serotipos 1, 2 y 3 (ningún serotipo 4). Estas extracciones eran originarias de la *Universidad Industrial de Santander* (Bucaramanga, Columbia) [5] o del Instituto Pasteur de Camboya (Phnom-Penh). Perteneciendo estos últimos a un estudio prospectivo llevado a cabo en acuerdo con el comité ético local. Las características de las dos fuentes de extracciones se detallan en las tablas 3 y 4 siguientes. Las muestras se han recogido después de la aparición de los síntomas.

Tabla 3: Muestras de plasma colombianas

	DF (n=15)	DS (n=15)	Valor de p
Edad media +-SD (año)	29,3+-0,52	28,3+-0,5	ns
% varón	60%	53%	ns
Extracción (día)	3,06	2,37	ns
Peso medio +-SD (Kg)	60,2 +-8,6	50,3+-15,6	ns
Colesterol total (g/l)	1,44+-5,4	1,29+-10,1	0,03
AST (U/l)	90,2+-9,75	142,7+-29,8	0,001
ALT (U/l)	69,7+-11,4	90,8+-24,5	ns
Ensayo torniquete positivo	8/15 (60%)	10/15 (66%)	ns
Carga viral (copia/ml)	4,05 10 ⁶ +-3,5	4,1 10 ⁷ +-5,22	0,006
Estereotipo	DV2-DV3	DV2-DV3	
Dengue secundario	Sí	Sí	
Comorbilidad	no	No	

Tabla 4: Muestras de plasma camboyanos

	DF (n=23)	DS (n=26)	Valor de p
Eda media +-SD (año)	8,6+-0,38	7,3+-0,45	ns
% varón	56%	35,6%	ns
Extracción (día)	2,6	3,2	ns
Peso medio +-SD (Kg)	20,48+-0,93	18,86+-0,98	ns
Colesterol total (mmol/l)	3,32+-0,14	2,37+-0,12	<0,0001
HDL (mmol/l)	0,82+-0,07	0,31+-0,02	<0,0001
Triglicéridos (g/l)	1,37+-0,17	2,8+-0,2	<0,0001
AST (IU/l)	133,3+-23,18	302,5+-50,7	0,0043
ALT (IU/l)	66,9+-13,4	106,3+-21,2	ns
Carga viral (copia/ml)	7,1 10 ⁸ +-6	2,06 10 ⁸ +-2	ns
Ensayo de torniquete positivo	19/23 (82%)	18/26 (69,2%)	ns
HGB	11,63+-0,15	13,3+-0,29	<0,0001
Hematocrito	38,23+-0,57	41,62+-0,8	0,0013
Hepatomegalia (Ultrasonidos)	8/12 (66%)	16/26 (61,5%)	ns
Serotipo	DV1	DV1	-
Dengue secundario	Sí	Sí	-
Comorbilidad	No	No	-

SD: desviación estándar

ns: valor de p no significativo

Resultados:

Para la mayoría de los marcadores ensayados en ELISA, no se ha constatado ninguna diferencia de concentración

plasmática entre los plasmas DF y DS, ya sean colombianos o camboyanos ($p>0,1$).

Por el contrario, para dos marcadores, los resultados permiten distinguir claramente los pacientes que han desarrollado después un dengue grave DS de los que siguen teniendo únicamente un dengue clásico sin evolucionar hacia un dengue grave. El primer marcador es OLFM4 (olfactomedina-4).

Para las muestras colombianas, la concentración plasmática del marcador es superior en las muestras DS con respecto a las muestras DF ($p=0,07$; véase la figura 2).

Esto se confirma en las muestras camboyanas con una diferencia de concentración extremadamente significativa ($p<0,0003$) y una media más de 2 veces superior para las muestras DS comparado con las muestras DF (figura 3). El AUC es de 0,858 (95%IC= 0,7307-0,985). La curva de ROC ha permitido determinar cuál era la mejor especificidad para una sensibilidad próxima al 100%. Los resultados se resumen en la tabla 5: para este marcador, para una sensibilidad próxima al 95%, se alcanza una especificidad superior al 72%.

Tabla 5

	Para una sensibilidad de:	La mejor especificidad es:
OLFM4	100	61
	94,4	72,2

- el segundo marcador es PF4 (platelet factor 4)

Para las muestras colombianas, se observa una diferencia de concentración plasmática a favor de las muestras DF ($p<0,001$) (figura 4). El AUC es de 0,88 (95%IC: 0,7305-1).

Esto se confirma para las muestras camboyanas para las cuales se tiene una diferencia de concentración plasmática significativa a favor de las muestras DF ($p<0,0001$) (figura 5). El AUC es de 0,94 (95%IC=0,87-1). La curva de ROC ha permitido determinar cuál era la mejor especificidad para una sensibilidad próxima al 100%. Los resultados se resumen en la tabla 6 siguiente: para este marcador, para una sensibilidad del 95%, se alcanza una especificidad de cerca del 78%.

Tabla 6

	Para una sensibilidad de:	La mejor especificidad es:
PF4	100	61
	95	77,9

En paralelo, otro marcador, el alfa-2 macroglobulina (A2M), se ha identificado a partir de muestras de plasmas camboyanos no purificadas, mediante un método de proteómica diferencial de tipo SILAC (*Stable Isotope Labelling by Aminoacids in cell Culture*) [6]. La identificación de este tercer marcador se describe en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 5: Caracterización de las muestras

La composición de cada grupo o pool de plasma utilizado en este experimento se resume en la tabla 7. Todos los plasmas camboyanos seleccionados para la constitución de los pools se han extraído durante la fase febril aguda de la enfermedad, antes de la fase crítica, sobre unos enfermos que tienen una infección secundaria. El serotipo en cuestión era el serotipo 1. Todos los pacientes DS estaban hospitalizados y presentaban síntomas de hemorragias. No se ha informado de ninguna comorbilidad. Todos los plasmas se verificaron como NS1-positivos (Kit Platelia Dengue Biorad) y la carga viral se verificó también en Q-RTPCR mediante un kit comercial siguiendo las instrucciones del proveedor: Los pools constituidos corresponden a un volumen de aproximadamente 2 ml de plasma. Los grupos de plasma se inactivan previamente con calor (56°C/20 minutos) y después preclarifican por una centrifugación de 5 minutos a 1000 g y a 4°C, a fin de quitar las impurezas presentes en la muestra.

Tabla 7

	DF (n=6)	DS (n=6)
Serotipo	DV1	DV1
Dengue secundario	SI	SI
Edad en años (media)	6-12 (8,6)	6-8 (7)
Varón/mujer	2/4	2/4
NS1 positivo / virus positivo	SI/SI	SI/SI
Día medio de extracción	4	3.85
Grado de severidad	0-1	3-4
Comorbilidad	NO	NO

Ejemplo 6: análisis en proteómica diferencial

El método utilizado es un método proteómico semi-cuantitativo de tipo SILAC (*Stable Isotope Labelling by*

Aminoacids in cell Culture) [6] desarrollado por la compañía Pronota (Gante, Bélgica) utilizando la plataforma MASStermind™ y ejecutado sobre los grupos de plasma dengue clásico DF o dengue grave DS. Cada grupo está constituido de una mezcla de 6 muestras, como se detalla en el ejemplo 5.

- 5 Estas mezclas de plasma se han agotado en las 14 proteínas plasmáticas más abundantes por cromatografía de afinidad. La cantidad de proteínas recuperadas al final se ha obtenido mediante un ensayo colorimétrico a base de ácido bicinonínico (BCA assay ThermoFisher Scientific Inc., USA).

10 El estudio MASStermind™ ha comparado cada muestra con una muestra de referencia que agrupa todas las muestras. Este método proporciona informaciones sobre los niveles relativos y la ausencia o la presencia de péptidos / proteínas en unas muestras dengue grave DS en comparación con muestras dengue clásico DF. El análisis diferencial se realiza mezclando las muestras marcadas por diferentes isótopos y analizando por espectrometría de masa cada pico emparejado. El marcador isotópico se introduce por hidrólisis tripsica que incorpora 2 átomos ¹⁸O (marcado "pesado") sobre la arginina C-terminal de un péptido, lo que conllevaría una diferencia de masa de 4 daltons con el mismo péptido marcado ¹⁶O ("marcado ligero"). La muestra de referencia se etiqueta con ¹⁶O mientras que las muestras individuales se etiquetan con ¹⁸O. Los datos MS/MS se someten después al programa MASCOT para la identificación de los péptidos y de las proteínas en cada muestra.

20 Tras el análisis MS / MS, se han podido identificar más de 250 proteínas cuantificables, incluyendo 10 proteínas que tienen al menos 1 péptido encontrado diferencial. Para cada proteína identificada, la relación DS /DF se calcula como la media ponderada de los coeficientes de todos los péptidos identificados para la proteína dada. Globalmente, los resultados han mostrado una gran similitud entre los dos proteomas y solamente se encontraron algunas proteínas se encontraron expresadas de manera diferencial. Para tres de estas diez proteínas, los péptidos identificados se expresan sistemáticamente de manera diferencial y presentan una relación DS/DF media que se desvía de 1 (véanse los resultados presentados en la tabla 8 siguiente). Las tres proteínas identificadas son: alfa-2 macroglobulina (A2M), el complemento C3f y la heparina cofactor-2. Estas proteínas son mayoritariamente unos elementos de la vía de coagulación o de la cascada del complemento.

Tabla 8

Proteínas	Número de acceso	Relación DS/DF	95% IC sobre la media de las relaciones
Alfa 2 macroglobulina	A2MG_HUMAN	0,33	0,25-0,44
Complemento C3f	CO3_HUMAN	0,89	0,68-1,17
Heparina cofactor 2	HEP2_HUMAN	2,25	1,71-2,95

Ejemplo 7: ELISA de confirmación

Método:

- 35 A fin de confirmar los resultados de espectrometría de masas, se han efectuado unos ELISA cuantitativos específicos por duplicado sobre plasmas individuales. Las proteínas ensayadas son las identificadas en el ejemplo 6: el alfa-2 macroglobulina (A2M), la proteína C3 del complemento, y la heparina co-factor 2.

40 Estos ELISA se efectuaron gracias a unos kits comerciales (USCN, China), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los análisis estadísticos (Ensayo de Man-Whitney y curva de ROC/AUC) se efectuaron con la ayuda del programa GraphPad Prism V4.03.

45 Cada marcador-candidato se ensayó sobre muestras individuales. Estas muestras eran unos plasmas de pacientes extraídos durante la fase febril aguda de la enfermedad (fase virémica). El seguimiento clínico de los pacientes ha mostrado que algunos se mantuvieron finalmente con un dengue clásico DF sin evolucionar hacia un dengue grave, mientras que otros habían evolucionado hacia un dengue grave DS. Todos los pacientes tenían un dengue secundario. Sólo se representó el serotipo 1. Estas extracciones eran originarias del Instituto Pasteur de Camboya (Phnom-Penh) y eran parte de un estudio prospectivo llevado a cabo de acuerdo con el comité ético local. Las características de la fuente de extracciones se detallan en la tabla 9.

Tabla 9

	DF (n=23)	DS (n=26)	valor de p
Edad media +-SD edad (año)	8,6+-0,38	7,3+-0,45	ns
% varón	56%	35,6%	ns
Extracción (día)	2,6	3,2	ns
Peso medio+-SD (Kg)	20,48+-0,93	18,86+-0,98	ns
Colesterol total (mmol/l)	3,32+-0,14	2,37+-0,12	<0,0001
HDL (mmol/l)	0,82+-0,07	0,31+-0,02	<0,0001
Triglicéridos (g/l)	1,37+-0,17	2,8+-0,2	<0,0001
AST (IU/l)	133,3+-23,18	302,5+-50,7	0,0043

ALT (IU/l)	66,9+-13,4	106,3+-21,2	ns
Carga viral (copia/ml)	7,1 10 ⁸ +-6	2,06 10 ⁸ +-2	ns
Ensayo del torniquete positivo	19/23 (82%)	18/26 (82,6%)	ns
HGB	11,63+-0,15	13,3+-0,29	<0,0001
Hematocrito	38,23+-0,57	41,62+-0,8	0,0013
Hepatomegalia (ultrasonidos)	8/12 (66%)	16/26 (61,5%)	ns
Serotipo	DV1	DV1	-
Dengue secundario	Sí	Sí	-
Comorbilidad	No	No	-

HBG: hemoglobina plasmática

SD: desviación estándar

ns: valor de p no significativo

Resultados:

Para la mayoría de los marcadores ensayados en ELISA (el complemento C3f y la heparina cofactor 2), no se ha constatado ninguna diferencia de concentración plasmática entre los plasmas DF y DS ($p>0,1$).

Sin embargo, para las muestras camboyanas ensayadas en ELISA para A2M, la diferencia de concentración era significativa ($p<0,0004$) con una mediana aproximadamente 2 veces superior para las muestras DF comparadas a las muestras DS (figura 6). El AUC era de 0,89 (95%IC= 0,75-1).

Para A2M, la curva de ROC ha permitido determinar cuál era la mejor especificidad para una sensibilidad próxima al 100%. Los resultados se resumen en la tabla 10: para una sensibilidad próxima al 94%, se alcanza una especificidad superior al 83%.

Tabla 10

	Para una sensibilidad de:	La mejor especificidad es:
A2M	100	72
	93,8	83,3

Referencias bibliográficas

1. SB Halstead. The lancet 2007; 370: 1644-52
2. AS Leong *et al.* Semin.Diagn.Pathol. 2007; 24(4):227-236
3. K. Clyde *et al.* J. Virol. 2006; 23: 11418-11431
4. Fields Virology, Fifth edition, Knipe DM ed., LWW
5. Villar-Centeno LA *et al.* Am. J.Trp.Med.Hyg. 2008; 78: 370-374 6. R. Drissi *et al.* FEBS J. 2013

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue grave, en el que:

a) se determina la cantidad de al menos un marcador que es la olfactomedina 4 en dicha muestra sanguínea,

b) se compara la cantidad de la olfactomedina 4 determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia de dicho marcador obtenido a partir de un grupo de individuos que han sido diagnosticados de padecer dengue no severo,

en el que si la cantidad de olfactomedina 4 determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se determina que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa a) se determina la cantidad de al menos otro marcador seleccionado entre el factor plaquetario 4 y $\alpha 2$ -macroglobulina en la muestra sanguínea y en la etapa b) se compara la cantidad de dicho otro marcador de la etapa a) con una cantidad de referencia de dicho otro marcador obtenido a partir de un grupo de individuos que se han diagnosticado de padecer dengue no severo, y si la cantidad de dicho al menos otro marcador determinada en la etapa a) es inferior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se determina que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa a) se determina la cantidad de al menos otros dos marcadores seleccionados entre el factor plaquetario 4 y $\alpha 2$ -macroglobulina en la muestra sanguínea y en la etapa b) se compara la cantidad de cada uno de los otros dos marcadores de la etapa a) con una cantidad de referencia para cada uno de dichos otros marcadores obtenida a partir de un grupo de individuos que se han diagnosticado de padecer dengue no severo y si la cantidad de cada uno de los otros marcadores determinada en la etapa a) es inferior a la cantidad de referencia de cada uno de los marcadores establecida en la etapa b), se determina que el paciente evolucionará hacia dengue severo.

4. Utilización de la olfactomedina 4 como marcador proteico para determinar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue severo.

5. Utilización según la reivindicación 4, que comprende también la utilización del factor plaquetario 4 como marcador proteico para determinar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue severo.

6. Utilización según la reivindicación 4 o 5, que comprende también la utilización de $\alpha 2$ -macroglobulina como marcador proteico para determinar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue severo.

7. Kit para determinar, *in vitro*, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue severo que comprende una pareja de unión de la olfactomedina 4 y una pareja de unión de la proteína NS1 del virus del dengue, seleccionándose dichas parejas de unión entre un receptor, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un análogo de anticuerpo o cualquier otro ligando.

8. Kit para determinar, *in vitro*, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue severo que comprende una pareja de unión de la olfactomedina 4 y una pareja de unión del factor plaquetario 4, seleccionándose dichas parejas de unión entre un receptor, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un análogo de anticuerpo o cualquier otro ligando.

9. Kit para determinar, *in vitro*, la probabilidad de que un paciente evolucione hacia un dengue severo que comprende una pareja de unión de la olfactomedina 4 y una pareja de unión de $\alpha 2$ -macroglobulina, seleccionándose dichas parejas de unión entre un receptor, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un análogo de anticuerpo o cualquier otro ligando.

10. Kit según la reivindicación 9, que comprende también una pareja de unión del factor plaquetario 4.

11. Kit según la reivindicación 8, 9 o 10, que comprende también una pareja de unión de la proteína NS1 del virus del dengue.

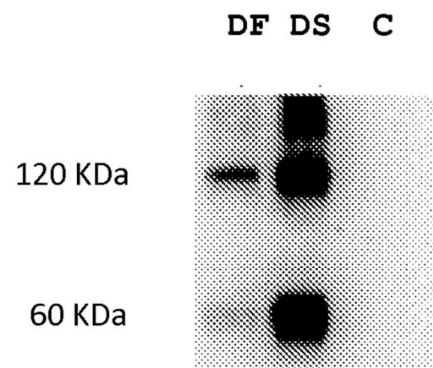


Figura 1

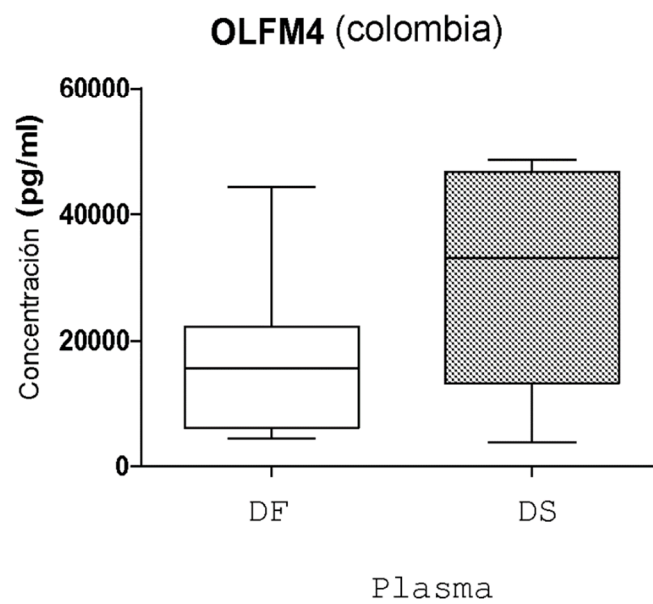


Figura 2

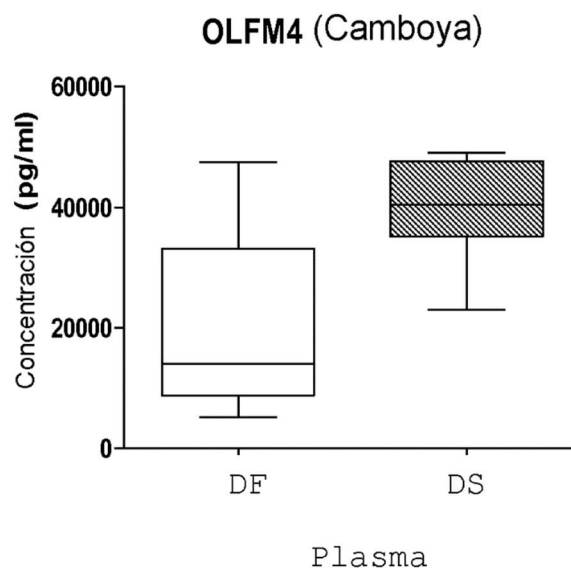


Figura 3

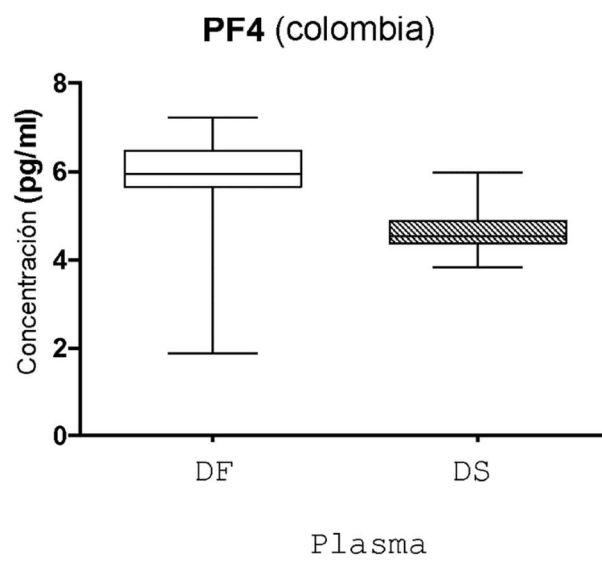


Figura 4

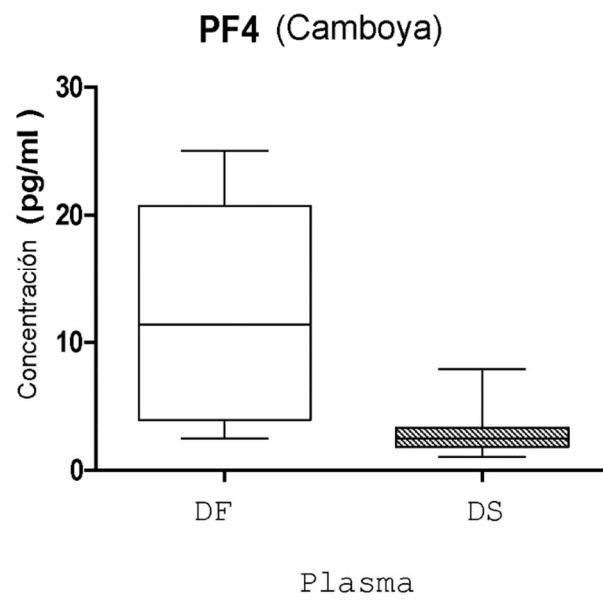


Figura 5

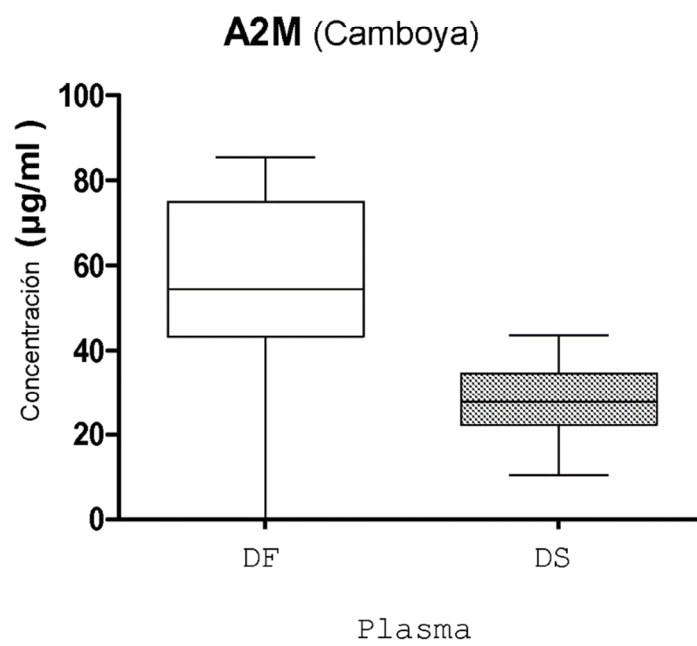


Figura 6