

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 968**

21 Número de solicitud: 201830379

51 Int. Cl.:

**G01N 33/497** (2006.01)

**G01N 30/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**18.04.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.10.2019**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (100.0%)**  
**C/ Escorxador s/n**  
**43003 TARRAGONA ES**

72 Inventor/es:

**IONESCU, Septimiu Radu y**  
**WELEAREGAY, Tesfalem Geremariam**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea que comprenden la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en una muestra de exhalado de un sujeto. La presente invención también se refiere al uso de muestras de exhalado para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea; al uso de al menos un compuesto orgánico volátil para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea; ya test y kits para llevar a cabo los métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mencionados anteriormente.

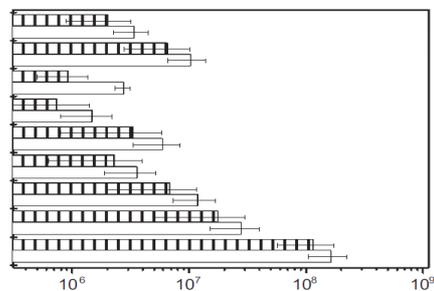


Fig. 1

**DESCRIPCIÓN**

**MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

5 El proyecto que ha llevado a esta solicitud de Patente ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizonte 2020 bajo el acuerdo de beca Marie Skłodowska-Curie Num. 645758.

Campo de la invención

10

La presente invención se refiere al sector de la biomedicina, más preferentemente al sector del diagnóstico biomédico. Más concretamente, la presente invención se refiere a métodos y procedimientos in vitro para el diagnóstico rápido y fiable de la Leishmaniasis cutánea, y a test y kits para llevar a cabo dichos métodos y procedimientos.

15

Antecedentes de la invención

20 La Leishmaniasis es una enfermedad parasítica endémica que se encuentra en la mayoría de partes de los trópicos, subtropicos y sur de Europa. La Leishmaniasis cutánea es la forma más común de Leishmaniasis y está causada por los parásitos protozoicos de la Leishmania, que se transmiten por medio del mordisco del flebótomo o mosca de la arena.

25 Aproximadamente, el 95% de los casos de Leishmaniasis cutánea se dan en América, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Se estima que al año se dan, aproximadamente, entre 600000 y 1 millón de casos en el mundo de Leishmaniasis cutánea. Normalmente, esta enfermedad afecta a algunas de las regiones más pobres de la Tierra y está asociada con malnutrición, desplazamientos de poblaciones, un sistema inmune débil y pocos recursos económicos. Aproximadamente dos terceras partes de los nuevos casos de Leishmaniasis cutánea se dan en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Irán y Siria.

30

35 La Leishmaniasis cutánea provoca lesiones en la piel, principalmente úlceras, en las partes expuestas del cuerpo, pudiendo dejar cicatrices y discapacidades serias para

toda la vida. Dichas lesiones en la piel se desarrollan tras varias semanas o meses desde la infección.

Sin embargo, la Leishmaniasis cutánea se puede tratar y es una enfermedad curable.

5 Para ello, juegan un papel muy importante tanto el diagnóstico temprano de la enfermedad como el tratamiento de los casos, que contribuyen a disminuir la prevalencia de la enfermedad y a prevenir discapacidades y la muerte en pacientes. La detección temprana de la enfermedad contribuiría a que se diera un tratamiento temprano de la misma y a reducir su transmisión y sus efectos.

10

Actualmente, la Leishmaniasis cutánea se diagnostica por medio de la detección del parásito en muestras de tejido; por medio de muestras provenientes de lesiones cutáneas; examinando con microscopía de luz muestras teñidas; ensayos inmunológicos en piel; utilizando técnicas de cultivo especializadas; o utilizando técnicas  
15 de biología molecular (entre otras, técnicas inmunológicas o serológicas y técnicas de amplificación de ADN o de ARN) (de Vries, HJC, Reedijk, SH, Schallig HDFH, Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management, 2015, 16:99-109).

20 Por tanto, los métodos de diagnóstico disponibles actualmente son costosos y complicados y, por tanto, la detección y control de la enfermedad resultan difíciles. Adicionalmente, se trata de métodos complicados, largos, laboriosos y que requieren de personal especializado para su realización (es decir, no los puede llevar a cabo el propio paciente). Otro problema existente en el estado de la técnica es el daño o molestias  
25 causados al paciente en la obtención de la muestra que, normalmente, tal y como se ha indicado anteriormente, en el estado de la técnica, son biopsias de lesiones cutáneas.

Por tanto, en el estado de la técnica sigue existiendo la necesidad y resultaría deseable disponer de métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea rápidos y fiables.

30 Adicionalmente, también existe la necesidad de disponer de métodos de diagnóstico de dicha enfermedad que no supongan una molestia para el paciente (por ejemplo, durante la toma de la muestra). De esta manera, se podría obtener un diagnóstico más temprano o precoz y fiable de la enfermedad permitiendo iniciar antes el seguimiento y/o tratamiento de los enfermos y, reduciendo, por tanto, los riesgos de complicaciones y la  
35 mortalidad asociada a la enfermedad así como los riesgos de transmisión o contagio.

En el estado de la técnica, también existe la necesidad de disponer de métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea que sean fáciles de llevar a cabo y de interpretar y que, por tanto, se puedan llevar a cabo en el domicilio del propio paciente, en centros de atención primaria y/o en farmacias.

5

Los inventores de la presente invención, tras extensos y exhaustivos experimentos, han descubierto métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea basados en la utilización de muestras de exhalado. Los métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea desarrollados por los presentes inventores han demostrado permitir un diagnóstico rápido, fiable, sensible y precoz de la enfermedad. Adicionalmente, la muestra utilizada permite no causar molestias al paciente durante su obtención. En algunas realizaciones, además, los métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea descubiertos por los presentes inventores son fáciles de realizar y de interpretar, permitiendo su realización en el domicilio del propio individuo que sospecha que padece dicha enfermedad, en centros de atención primaria y/o en farmacias. Adicionalmente, los inventores de la presente invención también han desarrollado test y kits para la implementación y la realización de los métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea de la presente invención. Por tanto, los inventores, con la presente invención logran resolver los problemas presentes en el estado de la técnica mencionados anteriormente.

20

#### Descripción de la invención

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea caracterizado porque comprende la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en una muestra de exhalado o aliento de un sujeto.

25

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de una muestra de exhalado o aliento de un sujeto para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

30

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto orgánico volátil para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea.

En un aspecto final, la presente invención se refiere a test o kits para llevar a cabo los

35

métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención.

En el presente documento, “exhalado”, “aliento” y sus plurales se utilizan de forma intercambiable y se refieren al aire que se expulsa al respirar o exhalar.

5

Tal y como se utiliza en el presente documento “nanomaterial” y su plural tienen el significado común que adquieren en el estado de la técnica, es decir, se refieren a materiales con propiedades morfológicas más pequeñas que 1  $\mu\text{m}$  en al menos una dimensión.

10

En el presente documento, “nanopartícula” y su plural se refieren a un nanomaterial en forma de partícula.

Por tanto, tal y como se ha mencionado anteriormente, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea caracterizado porque comprende la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en una muestra de exhalado.

El presente método de diagnóstico es un método in vitro.

20

En el método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención la muestra de exhalado es de un sujeto, preferentemente, de un mamífero, más preferentemente, de un humano.

Se contempla que la Leishmaniasis cutánea a diagnosticar esté provocada o causada por cualquier parásito de *Leishmania* conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania arabica*, *Leishmania archibaldi*, *Leishmania aristedes*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania colombiensis*, *Leishmania deanei*, *Leishmania donovani*, *Leishmania enriettii*, *Leishmania equatorensis*, *Leishmania forattinii*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania gerbili*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania herreri*, *Leishmania hertigi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania killicki*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania pifanoi*, *Leishmania shawi*, *Leishmania turanica*, *Leishmania tropica* y *Leishmania venezuelensis*.

35

Se contempla que la detección del al menos un compuesto orgánico volátil sea la detección cualitativa o cuantitativa (preferentemente, cuantitativa) directa de un compuesto orgánico volátil o una combinación de los mismos (primera realización del método de diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea de la presente invención); o  
5 mediante detección indirecta de al menos un compuesto orgánico volátil (preferentemente, combinaciones de compuestos orgánicos) (segunda realización del método de diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea de la presente invención).

10 La muestra de exhalado se contempla que sea recogida u obtenida por cualquiera de los procedimientos o métodos conocidos en el estado de la técnica ahora o en el futuro y, por tanto, utilizando, en los casos en los que sea necesario, cualquiera de los dispositivos conocidos en el estado de la técnica ahora o en el futuro para recoger muestras de exhalado. En una realización preferente, la muestra de exhalado se recoge  
15 u obtiene con un dispositivo de recogida de muestras de exhalado conocido en el estado de la técnica, tales como, Bio-VOC (Markes International Ltd, Reino Unido); la bolsa Tedlar (SKC Inc., PA, Estados Unidos) y/o la bolsa Mylar (Quintron, Milwaukee, WI, Estados Unidos), aún más preferentemente la muestra de exhalado se recoge u obtiene con un dispositivo Bio-VOC (Markes International Ltd, Reino Unido).

20 Se contempla que la muestra de exhalado recogida u obtenida de acuerdo a lo indicado anteriormente, sea utilizada tal cual se ha recogido, es decir, sin aplicarle ningún tratamiento previo (sin aplicar ninguna etapa de pretratamiento). Alternativamente, también se contempla que la muestra de exhalado recogida u obtenida de acuerdo a lo  
25 indicado anteriormente, sea pretratada por medio de una o varias de: una etapa de filtrado, una etapa de preconcentración, una etapa de condensación y/o una etapa de deshumidificación, más preferentemente, a la muestra de exhalado se le aplica una etapa de preconcentración. En dicha etapa de preconcentración, la muestra de exhalado preferentemente es transferida a un tubo preconcentrador de compuestos orgánicos volátiles.  
30 Dicho tubo preconcentrador de compuestos orgánicos volátiles puede ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica, ahora o en el futuro. Dicho tubo preconcentrador de compuestos orgánicos volátiles generalmente comprende un material absorbente. Preferentemente, el tubo preconcentrador comprende como material absorbente Tenax TA (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

35

Se contempla que la muestra de exhalado sea analizada justo después de ser recogida (por ejemplo, por conexión directa de los medios o dispositivo utilizados para la recolección de la muestra y los medios o dispositivo utilizado para el análisis de la misma) o que dicha muestra de exhalado se almacene en condiciones adecuadas para ser analizada con posterioridad (separación temporal entre la recolección de la muestra de exhalado y su análisis). Se contempla que las condiciones adecuadas para almacenar la muestra de exhalado sean a 4°C o inferior, más preferentemente entre -80°C y 4°C, más preferentemente entre -20°C y 4°C, aún más preferentemente 4°C. En las condiciones indicadas, se puede conservar la muestra de exhalado sin pérdidas apreciables durante al menos un año y medio.

En una primera realización del método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención, el al menos un compuesto orgánico volátil (en adelante, COV) a detectar en la muestra de exhalado es COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 08, COV 09 o combinaciones de los mismos, donde dichos compuestos orgánicos volátiles presentan las características indicadas en la tabla 1 en cromatografía de gases acoplada a cuadrupolo de tiempo de vuelo (en adelante, GC/Q-TOF, por sus siglas en inglés):

Tabla 1. Características de los compuestos orgánicos volátiles en GC/Q-TOF.

<b>Compuesto orgánico volátil</b>	<b>Masa/carga (m/z)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
COV 01	57,05	4,348
COV 02	67,05	4,899
COV 03	43,05	5,279
COV 04	43,05	5,995
COV 05	85,01	6,526
COV 06	81,06	9,50
COV 07	57,05	9,749
COV 08	71,06	10,079
COV 09	67,05	10,861

Los compuestos específicos asignados a los compuestos orgánicos volátiles mencionados anteriormente (tabla 1) son los indicados en la tabla 2:

Tabla 2. Compuestos específicos asignados a cada uno de los compuestos orgánicos volátiles en función de sus características en GC/Q-TOF de acuerdo a la tabla 1.

Compuesto orgánico volátil	Compuesto
COV 01	2,2,4-trimetil pentano
COV 02	4-metil-2-etil-1-pentanol
COV 03	metilvinil cetona
COV 04	nonano
COV 05	2,3,5-trimetil hexano
COV 06	Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato
COV 07	octano
COV 08	3-etil-3-metilpentano
COV 09	2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol

Se contempla que los compuestos orgánicos volátiles puedan ser otros diferentes que presenten una estructura parecida o equivalente a los indicados en la tabla 2; o que tengan una masa/carga (m/z) y un tiempo de retención igual o similar a lo indicado en la tabla 1.

Por tanto, preferentemente, el al menos un compuesto orgánico volátil a medir en el método para el diagnóstico de la presente invención es 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; metilvinil cetona; nonano; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; octano; 3-etil-3-metilpentano; 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol; o combinaciones de los mismos. Tal como se ha indicado anteriormente, también se contempla que los compuestos orgánicos volátiles a detectar puedan ser otros diferentes que presenten una estructura parecida o equivalente a los indicados anteriormente; o que tengan una masa/carga (m/z) y un tiempo de retención similares a los indicados anteriormente.

Se contempla que en el método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención el al menos un compuesto orgánico volátil a detectar o medir en la muestra de exhalado sea un compuesto orgánico volátil. En la realización más preferente, en el método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención el al menos un compuesto orgánico volátil a detectar o medir en la muestra de exhalado es una combinación de compuestos orgánicos volátiles (es decir, al menos

dos compuestos orgánicos volátiles). Más preferentemente, dicha combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:

- 5        - COV 03, COV 06.
- COV 01, COV 06, COV 07.
- COV 01, COV 02, COV 06, COV 07.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 06, COV 07.
- COV 01, COV 02, COV 05, COV 06, COV 07, COV 09.
- 10       - COV 01, COV 02, COV 03, COV 05, COV 08, COV 09.
- COV 01, COV 02, COV 04, COV 05, COV 06, COV 08, COV 09.
- COV 01, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 08, COV 09.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 08, COV 09.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 08, COV
- 15       09.

Aún más preferentemente, dicha combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:

- COV 03, COV 06.
- 20       - COV 01, COV 06, COV 07.

Por tanto, más preferentemente, la combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:

- metilvinil cetona y Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil
- 25       acetato.
- 2,2,4-trimetil pentano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil
- acetato; y octano.
- 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-
- 2-butenil)ciclohexil)metil acetato; y octano.
- 30       - 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; metilvinil cetona; Hidroxi-2,4,6-
- trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; y octano.
- 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-
- 2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; octano; y 2-metil-6-
- metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
- 35       - 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; metilvinil cetona; 2,3,5-trimetil

- hexano; 3-etil-3-metilpentano; y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
- 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; nonano; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; 3-etil-3-metilpentano; y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
- 5
- 2,2,4-trimetil pentano; metilvinil cetona; nonano; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; 3-etil-3-metilpentano; y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
  - 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; metilvinil cetona; nonano; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato;
- 10
- 3-etil-3-metilpentano; y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
  - 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; metilvinil cetona; nonano; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; octano; 3-etil-3-metilpentano; y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
- 15
- Aún más preferentemente, la combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:
- metilvinil cetona y Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato.
- 20
- 2,2,4-trimetil pentano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; y octano.

Preferentemente, en esta primera realización del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención, la detección del al menos un compuesto orgánico volátil, comprende la cuantificación de dicho al menos un compuesto orgánico volátil. Dicha cuantificación puede ser exacta o aproximada. Dicha cuantificación se hace por medio de la medida de una o más variables o características del al menos un compuesto orgánico volátil en la muestra de exhalado.

30

En esta primera realización del método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención, se contempla que la detección (preferentemente, cuantificación) del al menos un compuesto orgánico volátil en la muestra de exhalado (obtenida y procesada de acuerdo a lo indicado anteriormente) sea realizada de acuerdo a cualquiera de los procedimientos y/o métodos disponibles en el estado de la técnica

35

ahora o en el futuro para la detección de compuestos orgánicos volátiles.

Preferentemente, la detección (preferentemente, cuantificación) del al menos un compuesto orgánico volátil en la muestra de exhalado se lleva a cabo por medio de cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (en adelante GC-MS, por sus siglas en inglés), GC/Q-TOF, cromatografía de gases bidimensional acoplada a espectroscopia de masas (en adelante GCxGC/MS, por sus siglas en inglés) y/o  
5 espectrometría de masas de reacción de transferencia de protones (en adelante PTR-MS, por sus siglas en inglés), más preferentemente, mediante GC/Q-TOF.

En la detección (preferentemente, cuantificación) del al menos un compuesto orgánico volátil en la muestra de exhalado mencionado anteriormente, se contempla medir  
10 cualquier variable o característica conocida en el estado de la técnica. Resulta evidente que la variable o característica medida dependerá de la técnica utilizada para la detección del al menos un compuesto orgánico volátil. En caso de utilizar un método cromatográfico, preferentemente se mide el área bajo el pico cromatógrafico para el al  
15 menos un compuesto orgánico volátil. Tal y como se ha indicado anteriormente, de forma preferente se utiliza GC/Q-TOF y, preferentemente, con dicha técnica se mide el área bajo el pico cromatográfico para el al menos un compuesto orgánico volátil.

Por otro lado, en esta realización del método para el diagnóstico de Leishamniasis cutánea de la presente invención, preferentemente cuando se detecta una combinación  
20 de compuestos orgánicos volátiles, se contempla que, preferentemente, tras las etapas mencionadas anteriormente, el método comprenda una etapa de análisis de los datos obtenidos (en la detección, preferentemente, cuantificación, del al menos un compuesto orgánico volátil en la muestra de exhalado). En dicha etapa se puede utilizar cualquier  
25 método de análisis de datos conocido ahora o en el futuro en el estado de la técnica. Preferentemente, el método para el diagnóstico de la presente invención comprende una etapa de análisis de datos en la que se utiliza un algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones (para llevar a cabo dicho análisis de datos) seleccionado de entre: algoritmos de red neuronal artificial (en adelante ANN, por sus siglas en inglés),  
30 análisis de componentes principales (en adelante PCA, por sus siglas en inglés), perceptrón multicapa (en adelante MLP, por sus siglas en inglés), red neuronal de regresión generalizada (en adelante GRNN por sus siglas en inglés), sistemas de inferencia difuso (en adelante FIS, por sus siglas en inglés), mapa auto-organizado (en adelante SOM, por sus siglas en inglés), función de base radial (en adelante RBF, por  
35 sus siglas en inglés), algoritmos genéticos (en adelante GAs, por sus siglas en inglés),

sistemas neurodifusos (en adelante NFS, por sus siglas en inglés), teoría de resonancia adaptativa (en adelante ART, por sus siglas en inglés), regresión de mínimos cuadrados parciales (en adelante PLS, por sus siglas en inglés), regresión lineal múltiple (en adelante MLR, por sus siglas en inglés), regresión de componentes principales (en adelante PCR, por sus siglas en inglés) o análisis de función discriminante (en adelante DFA, por sus siglas en inglés), aún más preferentemente DFA.

Alternativamente, esta primera realización del método de diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea, también preferentemente no comprende una etapa de análisis de los datos de acuerdo a lo indicado anteriormente y que los datos obtenidos o medidos sean directamente utilizados en la etapa de comparación mencionada o explicada a continuación.

Directamente tras la detección (preferentemente, cuantificación) del al menos un compuesto orgánico volátil o tras la etapa de análisis mencionada anteriormente o conjuntamente con dicha etapa de análisis mencionada anteriormente se lleva a cabo una comparación de los resultados obtenidos con los obtenidos para un sujeto control o un grupo de sujetos control (individuos o sujetos que no presentan Leishmaniasis cutánea) con el fin de determinar la presencia o ausencia de Leishmaniasis cutánea en la muestra analizada. La presencia de diferencias significativas en la muestra exhalada analizada en relación con el sujeto control o un grupo de sujetos control determina la presencia de Leishmaniasis cutánea y, por tanto, el diagnóstico del paciente como infectado con Leishmaniasis cutánea. En una realización preferente, la comparación de los resultados obtenidos se lleva a cabo frente a un valor umbral obtenido para un grupo de sujetos control. La presencia de diferencias significativas respecto a este valor umbral determina la presencia de Leishmaniasis cutánea y, por tanto, el diagnóstico del paciente como infectado con Leishmaniasis cutánea. En la realización más preferente, el algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones mencionado anteriormente se entrena con los resultados obtenidos para muestras de un grupo de pacientes con Leishmaniasis cutánea y de un grupo de control, y será dicho algoritmo entrenado el utilizado para determinar si una muestra debe ser diagnosticada como Leishmaniasis cutánea o no (es decir, el algoritmo entrenado incorporaría el valor umbral mencionado anteriormente).

Finalmente, en esta realización se contempla que haya una etapa final de transmisión

de los resultados al usuario. En caso de que el método para el diagnóstico de la presente invención comprenda una o más etapas de análisis y/o comparación de datos o resultados, también se contempla la presencia de una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al usuario. Dicha una o más etapas intermedias de  
 5 transmisión de los resultados al usuario, mostrarían los resultados crudos (es decir, sin analizar y/o comparar) y/o parcialmente analizados y/o comparados. Se entiende que el usuario es la persona que está llevando a cabo el método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención. Dicha etapa final de transmisión de los resultados y/o dichas una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al  
 10 usuario contemplan que los resultados sean transmitidos al usuario por cualquier medio conocido o contemplado (ahora o en el futuro) en el estado de la técnica, más preferentemente, los resultados se transmiten al usuario por medio de una pantalla o por medio de uno o varios sonidos o señales acústicas o por medio de una o varias señales visuales.

15

En esta primera realización del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención se contempla que los resultados sean obtenidos utilizando una unidad de procesamiento de datos debidamente configurada. Particularmente, se contempla que la una o más etapas de análisis y/o comparación de datos y/o la etapa  
 20 de transmisión de los resultados al usuario sean llevadas a cabo mediante una unidad de procesamiento.

En una segunda realización del método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención, dicho método de diagnóstico se caracteriza porque la muestra  
 25 de exhalado (obtenida y procesada de acuerdo a lo indicado anteriormente) se analiza para la detección de al menos un compuesto orgánico volátil mediante un dispositivo que comprende al menos un sensor que, a su vez, comprende al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles, más preferentemente dicho al menos un material que reacciona química y/o físicamente con  
 30 compuestos orgánicos volátiles comprende o consiste en al menos un nanomaterial funcionalizado y/o recubierto por al menos un compuesto orgánico (que sería el que reaccionaría química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles).

Preferentemente, en esta realización del método para el diagnóstico de Leishmaniasis  
 35 cutánea de la presente invención la detección de al menos un compuesto orgánico volátil

comprende las etapas de: exposición del al menos un sensor (preferentemente uno) a la muestra de exhalado; y detección del cambio en al menos una de las propiedades del sensor, más preferentemente del cambio en al menos una de las propiedades del al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles (dicho material es de acuerdo a lo explicado anteriormente y a lo que se explicará a continuación).

De forma preferente, en la etapa de detección del cambio en al menos una de las propiedades del sensor mencionada anteriormente, se contempla que la al menos una propiedad del sensor sea resistencia, conductancia, capacitancia, impedancia, inductancia, corriente continua, corriente alterna, frecuencia, masa, voltaje, fluorescencia, propiedades ópticas, quimioluminiscencia, fosforescencia, piezoelectricidad, ondas acústicas o combinaciones de las mismas, más preferentemente, la al menos una propiedad es corriente continua.

Por tanto, en este caso, la utilización de los sensores mencionados anteriormente determina que no se detecta en la muestra de exhalado la cantidad o presencia de un único compuesto orgánico volátil o un grupo de compuestos orgánicos volátiles específico directamente sino que se detectan y analizan patrones o conjuntos de compuestos orgánicos volátiles en la muestra, por medio del efecto que tienen dichos compuestos orgánicos volátiles sobre el sensor o combinación de sensores. Es decir, en este caso, el al menos un compuesto orgánico volátil se detecta de forma indirecta, detectando uno o más cambios en propiedades del sensor (más preferentemente del al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles, aún más preferentemente, al menos un nanomaterial funcionalizado y/o recubierto con al menos un compuesto orgánico) que produce dicho al menos un compuesto orgánico volátil.

Preferentemente, el al menos un nanomaterial mencionado anteriormente son nanopartículas de metal, más preferentemente son nanopartículas de cobre (en adelante, Cu), oro (en adelante, Au), platino (en adelante, Pt), paladio (en adelante, Pd), plata (en adelante, Ag), níquel (en adelante, Ni), cobalto (en adelante, Co), aluminio (en adelante, Al) o combinaciones de las mismas, más preferentemente, nanopartículas de cobre (en adelante, Cu), oro (en adelante, Au), platino (en adelante, Pt) o combinaciones de las mismas, aún más preferentemente, nanopartículas de cobre (en adelante, Cu),

oro (en adelante, Au) o platino (en adelante, Pt).

De forma preferente, dichas nanopartículas de metal presentan un diámetro de entre 1 y 100 nm, más preferentemente, presentan un diámetro de entre 1 y 20 nm.

5

De forma preferente, cuando las nanopartículas de metal son nanopartículas de oro, dichas nanopartículas de oro presentan un diámetro de entre 1 y 20 nm, más preferentemente, un diámetro aproximado de 10 nm, aún más preferentemente un diámetro de 10 nm.

10

De forma preferente, cuando las nanopartículas de metal son nanopartículas de cobre, dichas nanopartículas de cobre presentan un diámetro de entre 1 y 10 nm, más preferentemente, presentan un diámetro aproximado de 4 nm, aún más preferentemente un diámetro de 4 nm.

15

De forma preferente, cuando las nanopartículas de metal son nanopartículas de platino, dichas nanopartículas de platino presentan un diámetro de entre 1 y 10 nm, más preferentemente, presentan un diámetro aproximado de 3 nm, aún más preferentemente un diámetro de 3 nm.

20

De forma preferente, dicho nanomaterial (preferentemente, nanopartículas de metal) funcionalizado y/o recubierto con al menos un compuesto orgánico presenta una resistencia de entre 500Ω y 100 MΩ.

25

De forma preferente, cuando las nanopartículas de metal son nanopartículas de oro, dichas nanopartículas de oro funcionalizadas y/o recubiertas con al menos un compuesto orgánico presentan una resistencia de entre 500Ω y 100 MΩ, más preferentemente entre 0,1 MΩ y 25 MΩ, aún más preferentemente entre 0,7 MΩ y 5,8 MΩ.

30

De forma preferente, cuando las nanopartículas de metal son nanopartículas de cobre, dichas nanopartículas de cobre funcionalizadas y/o recubiertas con al menos un compuesto orgánico presentan una resistencia de entre 500Ω y 100 MΩ, más preferentemente de entre 0,1 MΩ y 25 MΩ, aún más preferentemente de entre 0,6 y 4,5

35

MΩ.

De forma preferente, cuando las nanopartículas de metal son nanopartículas de platino, dichas nanopartículas de platino funcionalizadas y/o recubiertas con al menos un compuesto orgánico presentan una resistencia de entre  $500\Omega$  y  $100\text{ M}\Omega$ , más  
5 preferentemente de entre  $0,1\text{ M}\Omega$  y  $25\text{ M}\Omega$ , aún más preferentemente de entre  $0,4$  y  $7,8\text{ M}\Omega$ .

Se contempla que las nanopartículas de metal mencionadas anteriormente se fabriquen u obtengan mediante cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica. De  
10 forma preferente, dichas nanopartículas de metal se fabrican u obtienen mediante el procedimiento indicado en el documento de publicación de la solicitud de patente española ES2566067A1.

El nanomaterial (preferentemente, nanopartículas de metal, más preferentemente, nanopartículas de Au, Cu, Pt o combinaciones de las mismas, aún más  
15 preferentemente, nanopartículas de Au, Cu o Pt) está en el sensor en cualquier forma conocida en el estado de la técnica, más preferentemente, se encuentran en forma de monocapa (depositada en el soporte elegido). De forma preferente, dicha monocapa se obtiene mediante el procedimiento indicado en el documento de publicación de la solicitud  
20 de patente española ES2566067A1.

Se contempla que el al menos un compuesto orgánico que funcionaliza y/o recubre el al menos un nanomaterial (preferentemente, nanopartículas de metal, más  
preferentemente nanopartículas de Cu, Au, Pt, Pd, Ag, Ni, Co, Al o combinaciones de  
25 las mismas, más preferentemente, nanopartículas de Cu, Au, Pt o combinaciones de las mismas, aún más preferentemente, nanopartículas de Au, Cu o Pt), sea cualquier compuesto orgánico o combinación de compuestos orgánicos que reaccione química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles, permitiendo, por tanto, su detección. Más preferentemente, el al menos un compuesto orgánico se selecciona de  
30 alquiltiols, ariltiols, alquilariltiols, alquiltiolatos, arenotiolatos o combinaciones de los mismos; aún más preferentemente, el al menos un compuesto orgánico se selecciona de 1-dodecanotiol, 11-mercaptoundecanol, 2-mercaptobenzoxazol, ácido 11-mercaptoundecanoico o combinaciones de los mismos.

35 La funcionalización y/o recubrimiento del al menos un nanomaterial (preferentemente,

nanopartículas de metal, más preferentemente nanopartículas de Au, Cu, Pt o combinaciones de las mismas, aún más preferentemente nanopartículas de Au, Cu o Pt) se lleva a cabo por cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica. Preferentemente, dicha funcionalización y/o recubrimiento se lleva a cabo por recubrimiento por inmersión, por recubrimiento por centrifugación o por recubrimiento por pulverización, más preferentemente por recubrimiento por inmersión.

De forma preferente, por tanto, el al menos un nanomaterial funcionalizado y/o recubierto con al menos un compuesto orgánico es:

10

- nanopartículas de Au funcionalizadas con 1-dodecanotiol;
- nanopartículas de Au funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico;
- 15 - nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol;
- nanopartículas de Pt funcionalizadas con 1-dodecanotiol;
- o combinaciones de las mismas.

Por tanto, preferentemente, el al menos un sensor (preferentemente, un sensor) comprende:

20

- nanopartículas de Au funcionalizadas con 1-dodecanotiol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 0,7 y 1 M $\Omega$ , aún más preferentemente de 0,7 M $\Omega$ ;
- 25 - nanopartículas de Au funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 5,8 y 6,7 M $\Omega$ , aún más preferentemente de 5,8 M $\Omega$ ;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 2,1 y 2,3 M $\Omega$ , aún más preferentemente de 2,3 M $\Omega$
- 30 - nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 4,2 y 4,5 M $\Omega$ , aún más preferentemente de 4,5 M $\Omega$ ;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 0,6 y 0,62 M $\Omega$ , aún
- 35

más preferentemente de 0,6 MΩ;

- nanopartículas de Pt funcionalizadas con 1-dodecanotiol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 7,8 y 8,2 MΩ, aún más preferentemente de 7,8 MΩ;
- 5      - o combinaciones de las mismas.

Más preferente, el al menos un sensor (preferentemente, un sensor) comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol.

- 10    Tal y como se ha indicado anteriormente, resulta preferente que el al menos un sensor sea un sensor.

También resulta preferente utilizar una combinación de sensores (matriz de sensores), más preferentemente, al menos seis sensores, aún más preferentemente seis sensores.

- 15    En este caso, preferentemente los sensores son como sigue:

- un sensor que comprende nanopartículas de Au funcionalizadas con 1-dodecanotiol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 0,7 y 1 MΩ, aún más preferentemente de 0,7 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Au funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 5,8 y 6,7 MΩ, aún más preferentemente de 5,8 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 2,1 y 2,3 MΩ, aún más preferentemente de 2,3 MΩ;
- 20    - un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 4,2 y 4,5 MΩ, aún más preferentemente de 4,5 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 0,6 y 0,62 MΩ, aún más preferentemente de 0,6 MΩ; y
- 30    - un sensor que comprende nanopartículas de Pt funcionalizadas con 1-dodecanotiol, más preferentemente este sensor tiene una resistencia de entre 7,8 y 8,2 MΩ, aún más preferentemente de 7,8 MΩ;

- 35    De forma preferente, el al menos un sensor (preferentemente, un sensor) está hecho de

silicio, alúmina, cerámica o vidrio, más preferentemente, está hecho de silicio. Adicionalmente, también de forma preferente, el sensor tiene dos electrodos de platino u oro, preferentemente de oro, que presentan una zona de separación entre ellos (preferentemente, de 15  $\mu\text{m}$ ) y en la que se deposita o coloca el al menos un material  
 5 que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles (de acuerdo a lo explicado anteriormente). Dichos electrodos mencionados anteriormente pueden presentar cualquier configuración o disposición conocida en el estado de la técnica, preferentemente, dichos electrodos son paralelos o interdigitados, más preferentemente, dichos electrodos son paralelos.

10

Tal y como se ha indicado anteriormente, en esta segunda realización del método de diagnóstico de la presente invención se contempla la utilización de un único sensor o una combinación de sensores. En este último caso, de forma preferente, los sensores actúan o funcionan de forma independiente de manera que se recogen los resultados  
 15 para cada uno de dichos sensores y, posteriormente, dichos resultados se combinan con el fin de obtener el diagnóstico.

De forma preferente, el dispositivo comprende una cámara de medidas cerrada herméticamente, en la que se coloca el al menos un sensor de acuerdo a lo indicado  
 20 anteriormente. Dicha cámara de medidas presenta un volumen y unas dimensiones adecuadas en función del caso. De forma preferente, dicha cámara de medidas presenta un volumen de 73,5 mL y unas dimensiones de 70x35x30  $\text{mm}^3$ . También de forma preferente, dicha cámara de medidas presenta al menos dos orificios, más preferentemente dos orificios de los que, en principio uno estaría destinado a la  
 25 introducción de la muestra de exhalado y para realizar el vacío en la cámara de medidas antes de cada medida, y el otro para evacuar la muestra de exhalado.

Con anterioridad a la introducción de las muestras en el dispositivo, más preferentemente en la cámara de medidas (para proceder a su análisis con el al menos  
 30 un sensor de acuerdo a lo indicado anteriormente) se realiza en dicho dispositivo (preferentemente, en la cámara de medidas) un vacío, preferentemente un vacío de 600 mbar, durante un tiempo adecuado, por ejemplo, entre 2 y 10 minutos, preferentemente durante 5 minutos, utilizando medios adecuados (por ejemplo, mediante bomba eléctrica externa o generador de vacío, preferentemente mediante bomba eléctrica externa).

35

Con el fin de llevar a cabo la detección del al menos un compuesto orgánico volátil, preferentemente, el al menos un sensor se hace funcionar de la siguiente manera o de acuerdo a las siguientes etapas:

5 - Opcionalmente, realización durante entre 2 y 10 minutos de vacío en la cámara de medidas, más preferentemente 5 minutos. Opcionalmente, en esta etapa, el al menos un sensor utilizado se alimenta a una tensión continua de entre 5 y 15 V durante al menos 5 segundos, más preferentemente a 8 V durante 10 segundos; y posteriormente se deja inactivo (sin alimentación de tensión) durante al menos 20 segundos,  
10 preferentemente durante 70 segundos. Este ciclo de activo (alimentación con tensión)-inactivo mencionado anteriormente se lleva a cabo para cada sensor entre 1 y 10 veces, preferentemente 4.

- Exposición del al menos un sensor a los compuestos orgánicos volátiles de la muestra de exhalado durante entre 2 y 10 minutos, más preferentemente, durante 5 minutos.  
15 Durante dicha exposición a la muestra de exhalado, el al menos un sensor utilizado se alimenta a una tensión continua de entre 5 y 15 V durante al menos 5 segundos, más preferentemente a 8 V durante 10 segundos; y posteriormente se deja inactivo (sin alimentación de tensión) durante al menos 20 segundos, preferentemente durante 70  
20 segundos. Este ciclo de activo (alimentación con tensión)-inactivo mencionado anteriormente se lleva a cabo para cada sensor entre 1 y 10 veces (es decir, entre 1 y 10 ciclos de activación), preferentemente 1. Durante estos ciclos, preferentemente, se mide la corriente continua que pasa a través del al menos un sensor (para cada uno de los sensores utilizados).

25 - Limpieza y purga del dispositivo, más preferentemente de la cámara de medidas. De forma preferente dicha cámara de medidas se limpia con nitrógeno (N<sub>2</sub>), aire sintético o vacío, preferentemente, con aire sintético (aplicado a un caudal suficiente, preferentemente de entre 0,1 L/min y 100 L/min, más preferentemente de 2 L/min)  
30 durante un tiempo suficiente, preferentemente durante entre 5 y 30 minutos, más preferentemente durante 30 minutos. Adicionalmente, de forma preferente, durante esta etapa de limpieza y purga los sensores se alimentan con una tensión adecuada para acelerar su limpieza y purga, más preferentemente, con una tensión de entre 5 y 15 V durante al menos 5 segundos, más preferentemente con una tensión de 10 V durante  
35 10 segundos y posteriormente se deja inactivo (sin alimentación de tensión) durante al

menos 20 segundos, preferentemente durante 70 segundos. Este ciclo de activo (alimentación con tensión)-inactivo se repite, para cada sensor, preferentemente durante toda la etapa de limpieza y purga.

5 En esta segunda realización del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención, se contempla la medición o extracción de cualquier señal o parámetro de la al menos una de las propiedades del al menos un sensor. De forma preferente, cuando la al menos una propiedad es corriente continua, del al menos un sensor se extrae durante la etapa de exposición del al menos un sensor a los  
10 compuestos orgánicos volátiles de la muestra de exhalado, durante cada ciclo de alimentación con tensión (de acuerdo a lo explicado anteriormente), al menos uno de los siguientes parámetros:

- Parámetro 1 (P1): Promedio de la corriente continua obtenida durante entre 1,1 y 1,4  
15 segundos en la mitad del periodo de exposición del sensor a la muestra de exhalado, más preferentemente, promedio de la corriente continua obtenida durante 1,22 segundos en la mitad del periodo de exposición del sensor a la muestra de exhalado.

- Parámetro 2 (P2): Promedio de la corriente continua obtenida durante los últimos entre 1,1 y 1,4 segundos de exposición del sensor a la muestra de exhalado, más  
20 preferentemente, promedio de la corriente continua obtenida durante los últimos 1,22 segundos de exposición del sensor a la muestra de exhalado.

- Parámetro 3 (P3): Área bajo la curva de respuesta durante los últimos entre 1,5 y 3 segundos de exposición del sensor a la muestra de exhalado, más preferentemente, área bajo la curva de respuesta durante los 1,78 últimos segundos de exposición del  
25 sensor a la muestra de exhalado.

- o combinaciones de los mismos.

más preferentemente, se miden o extraen los tres parámetros mencionados anteriormente del al menos un sensor.

30

Se contempla que el dispositivo mencionado anteriormente comprenda o esté conectado (de forma física o inalámbrica, preferentemente de forma física) a al menos un instrumento conocido (ahora o en el futuro) en el estado de la técnica y que permita medir el cambio de al menos una de las propiedades del al menos un sensor  
35 mencionado anteriormente. Dicho cambio, tal y como se ha mencionado anteriormente

está provocado por la interacción con uno o más compuestos orgánicos volátiles de la muestra de exhalado. El dispositivo comprende o está conectado, por ejemplo, a uno o más de los siguientes instrumentos: instrumentos que miden resistencia, instrumentos que miden conductancia, instrumentos que miden capacitancia, instrumentos que miden impedancia, instrumentos que miden inductancia, instrumentos que miden corriente continua, instrumentos que miden corriente alterna, instrumentos que miden frecuencia, instrumentos que miden masa, instrumentos que miden voltaje, instrumentos que miden fluorescencia, instrumentos que miden propiedades ópticas, instrumentos que miden quimioluminiscencia, instrumentos que miden fosforescencia, instrumentos que miden piezoelectricidad, instrumentos que miden ondas acústicas, instrumentos que miden dos o más de las propiedades o variables indicadas anteriormente o combinaciones de las mismas, más preferentemente el dispositivo comprende o está conectado a uno o más instrumentos que miden corriente continua. En consecuencia, en la etapa de detección del cambio en al menos una de las propiedades del sensor mencionada anteriormente, se contempla que la al menos una propiedad del sensor sea resistencia, conductancia, capacitancia, impedancia, inductancia, corriente continua, corriente alterna, frecuencia, masa, voltaje, fluorescencia, propiedades ópticas, quimioluminiscencia, fosforescencia, piezoelectricidad, ondas acústicas o combinaciones de las mismas, más preferentemente, la al menos una propiedad es corriente continua.

20

Por otro lado, la segunda realización del método de diagnóstico de Leishamniasis cutánea de la presente invención, tras las etapas mencionadas anteriormente, preferentemente, comprende una etapa de análisis de los datos obtenidos (en la detección del al menos un compuesto orgánico volátil de la muestra de exhalado con el al menos un sensor). En dicha etapa se puede utilizar cualquier método de análisis de datos conocido ahora o en el futuro en el estado de la técnica. Preferentemente, el método para el diagnóstico de la presente invención comprende una etapa de análisis de datos en la que se utiliza un algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones seleccionado de entre: algoritmos de red neuronal artificial (en adelante ANN, por sus siglas en inglés), análisis de componentes principales (en adelante PCA, por sus siglas en inglés), perceptrón multicapa (en adelante MLP, por sus siglas en inglés), red neuronal de regresión generalizada (en adelante GRNN por sus siglas en inglés), sistemas de inferencia difuso (en adelante FIS, por sus siglas en inglés), mapa auto-organizado (en adelante SOM, por sus siglas en inglés), función de base radial (en adelante RBF, por sus siglas en inglés), algoritmos genéticos (en adelante GAs, por sus

35

siglas en inglés), sistemas neurodifusos (en adelante NFS, por sus siglas en inglés), teoría de resonancia adaptativa (en adelante ART, por sus siglas en inglés), regresión de mínimos cuadrados parciales (en adelante PLS, por sus siglas en inglés), regresión lineal múltiple (en adelante MLR, por sus siglas en inglés), regresión de componentes  
5 principales (en adelante PCR, por sus siglas en inglés) o análisis de función discriminante (en adelante DFA, por sus siglas en inglés), aún más preferentemente DFA.

Tras la etapa de análisis mencionada anteriormente o conjuntamente con dicha etapa  
10 de análisis se lleva a cabo una etapa de comparación de los resultados obtenidos con los obtenidos para un sujeto control o un grupo de sujetos control (individuos o sujetos que no presentan Leishmaniasis cutánea) con el fin de determinar la presencia o ausencia de Leishmaniasis cutánea en la muestra analizada. La presencia de diferencias significativas en la muestra exhalada analizada en relación con el sujeto  
15 control o un grupo de sujetos control determina la presencia de Leishmaniasis cutánea y, por tanto, el diagnóstico del paciente como infectado con Leishmaniasis cutánea. En una realización preferente, la comparación de los resultados obtenidos se lleva a cabo frente a un valor umbral obtenido para un grupo de sujetos control. La presencia de diferencias significativas respecto a este valor umbral determina la presencia de  
20 Leishmaniasis cutánea y, por tanto, el diagnóstico del paciente como infectado con Leishmaniasis cutánea. En la realización más preferente, el algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones mencionado anteriormente se entrena con los resultados obtenidos para muestras de un grupo de pacientes con Leishmaniasis cutánea y de un grupo de control, y será dicho algoritmo entrenado el utilizado para determinar si una  
25 muestra debe ser diagnosticada como Leishmaniasis cutánea o no (es decir, el algoritmo entrenado incorporaría el valor umbral mencionado anteriormente).

Finalmente, se contempla que en esta segunda realización del método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención haya una etapa final de  
30 transmisión de los resultados al usuario. En caso de que el método para el diagnóstico de la presente invención comprenda una o más etapas de análisis y/o comparación de datos o resultados, también se contempla la presencia de una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al usuario. Dicha una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al usuario, mostrarían los resultados crudos (es decir, sin  
35 analizar y/o comparar) y/o parcialmente analizados y/o comparados. Se entiende que el

usuario es la persona que está llevando a cabo el método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención. Dicha etapa final de transmisión de los resultados y/o dichas una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al usuario contemplan que los resultados sean transmitidos al usuario por cualquier medio conocido o contemplado (ahora o en el futuro) en el estado de la técnica, más preferentemente, los resultados se transmiten al usuario por medio de una pantalla o por medio de uno o varios sonidos o señales acústicas o por medio de una o varias señales visuales.

En la segunda realización del método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención se contempla que los resultados sean obtenidos utilizando una unidad de procesamiento de datos debidamente configurada. Particularmente, se contempla que la una o más etapas de análisis y/o comparación de datos y/o la etapa de transmisión de los resultados al usuario sean llevadas a cabo mediante una unidad de procesamiento.

El método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención permite solucionar los problemas presentes en el estado de la técnica mencionados anteriormente, es decir, permite proporcionar métodos rápidos y fiables para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea, basados en muestras cuya obtención no supone una molestia o malestar para el paciente (en las dos realizaciones mencionadas anteriormente). Adicionalmente, la segunda de las realizaciones del método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención permite, además, proporcionar métodos diagnósticos fáciles de llevar a cabo y de interpretar y que, por tanto, se pueden llevar a cabo en el domicilio del propio paciente, en centros de atención primaria y/o en farmacias, resolviendo otro de los problemas presentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente.

Por tanto, de forma preferente, el método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) recogida de la muestra de exhalado de un sujeto;
- b) análisis de la muestra de exhalado recogida en la etapa a) para la detección de al menos un compuesto orgánico volátil;
- c) análisis y/o comparación de los resultados obtenidos en la etapa b) para

- determinar si el sujeto padece Leishmaniasis cutánea; y  
d) transmisión de los resultados.

La muestra de exhalado de un sujeto, tal y como se ha mencionado anteriormente, es,  
5 preferentemente, de un mamífero, más preferentemente, de un humano.

La muestra de exhalado del sujeto se recoge u obtiene de acuerdo a lo indicado anteriormente.

10 De forma opcional, tras la recogida de la muestra del sujeto y antes de la etapa b), se puede llevar a cabo el pretratamiento de la muestra de exhalado recogida, de acuerdo a lo indicado anteriormente.

Tal y como se ha indicado anteriormente, la etapa b) se puede llevar a cabo o realizar  
15 justo a continuación de la etapa a); o la muestra se puede almacenar en condiciones adecuadas para hacer la etapa b) con posterioridad. Es decir, las etapas a) y b) pueden estar concatenadas temporalmente o pueden estar separadas temporalmente. En caso de no estar concatenadas temporalmente las etapas a) y b), sino separadas temporalmente, la muestra de exhalado se almacena de acuerdo a lo indicado  
20 anteriormente.

La detección de al menos un compuesto orgánico volátil en la etapa b) se lleva a cabo de acuerdo a lo indicado anteriormente.

25 En la etapa c), se lleva a cabo un análisis y/o comparación de los datos obtenidos en la etapa b) con el fin de detectar o medir la presencia de diferencias o no respecto a sujetos (preferentemente un humano) sanos o control (sin Leishmaniasis cutánea) con el fin de determinar si el sujeto (preferentemente un humano) padece o no Leishmaniasis cutánea.

30

Tal como se ha indicado anteriormente, el método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención es un método de diagnóstico in vitro.

Todas las etapas son de acuerdo a lo explicado anteriormente.

35

En un segundo aspecto, tal y como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere al uso de una muestra de exhalado de un sujeto para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

- 5 La muestra de exhalado de un sujeto, tal y como se ha mencionado anteriormente, es, preferentemente, de un mamífero, más preferentemente, de un humano.

Adicionalmente, se contempla que la muestra de exhalado sea recogida y procesada o pretratada de acuerdo a lo indicado anteriormente para los métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

10

El uso de la presente invención, implica la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en la muestra de exhalado. Dicha detección y/o análisis es de acuerdo a lo indicado anteriormente para los métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención.

15

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto orgánico volátil para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

- 20 En una realización preferente, el al menos un compuesto orgánico volátil se encuentra o detecta en una muestra de exhalado de un sujeto.

La muestra de exhalado de un sujeto, tal y como se ha mencionado anteriormente, es, preferentemente, de un mamífero, más preferentemente, de un humano.

25

Tanto el al menos un compuesto orgánico volátil como su detección es de acuerdo a lo explicado anteriormente para el método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención.

- 30 En un cuarto y último aspecto, la presente invención se refiere a test o kits adecuados para llevar a cabo los métodos diagnósticos de Leishmaniasis cutánea de la presente invención.

Tal como resultará evidente, dichos test o kits comprenderán los reactivos y/o dispositivos necesarios para llevar a cabo los métodos para el diagnóstico de

35

Leishmaniasis cutánea de la presente invención.

Adicionalmente, se contempla que dichos test y kits comprendan instrucciones para llevar a cabo los métodos de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente  
5 invención.

Finalmente, se contempla que los medios de transmisión del resultado del test o kit (es decir, del resultado del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención) estén comprendidos en el propio test o kit o sean ajenos al mismo (por  
10 ejemplo, pantalla de ordenador). En una realización preferente los medios de transmisión están comprendidos en el propio test o kit y pueden ser cualquiera de los conocidos (ahora o en el futuro) en el estado de la técnica, más preferentemente son una o más pantallas o uno o más sonidos o una o más señales acústicas o una o más señales visuales.

15

Para una mejor comprensión, la presente invención se describe en más detalle a continuación en referencia a las figuras adjuntas y a los siguientes ejemplos no limitativos.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra las áreas bajo el pico cromatográfico de los compuestos orgánicos volátiles COV01 a COV09 obtenidas en el ejemplo 1.

25 La figura 2 muestra los resultados obtenidos para la combinación de COVs COV01, COV06 y COV07 en el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea, de acuerdo al ejemplo 1.

La figura 3 muestra los resultados obtenidos con el sensor S3 (ver tabla 5) en el  
30 diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea, de acuerdo al ejemplo 2.

La figura 4 muestra la curva ROC (curva de teoría de detección de señales) obtenida para el sensor S3, de acuerdo al ejemplo 2.

35 La figura 5 muestra una vista en perspectiva de un ejemplo de dispositivo a utilizar en

la segunda realización del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención.

5 La figura 6 muestra una vista en planta del dispositivo mostrado en la figura 5. Por otro lado, en la figura 6 también se muestran las secciones A-A y A-B correspondientes a las vistas en perspectiva de las figuras 7 y 8, respectivamente.

10 La figura 7 muestra una vista en perspectiva del dispositivo mostrado en la figura 5, de acuerdo a la sección A-A indicada en la figura 6.

La figura 8 muestra una vista en perspectiva del dispositivo mostrado en la figura 5, de acuerdo a la sección A-B indicada en la figura 6.

#### Descripción detallada de las figuras

15 La figura 1 muestra las áreas bajo el pico cromatográfico de los compuestos orgánicos volátiles COV01 a COV09 obtenidas en el ejemplo 1 incluido abajo (de acuerdo a la primera realización del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención), tanto para el grupo control como para el grupo de pacientes con  
20 Leishmaniasis cutánea. El eje de las x muestra la media muestral del área bajo el pico cromatográfico para cada uno de los COVs analizados y el error estándar de la misma. Por su parte, el eje de las y hace referencia a los COV analizados, de arriba a abajo, cada grupo de dos barras se refiere a: COV09, COV08, COV07, COV06, COV05, COV04, COV03, COV02 y COV01. Las barras con rayas verticales hacen referencia o  
25 corresponden al grupo control y las barras blancas o vacías hacen referencia o corresponden al grupo de pacientes con Leishmaniasis cutánea.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos para la combinación de COVs COV01, COV06 y COV07 en el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea, de acuerdo al ejemplo  
30 1. El eje de las x muestra los grupos siendo, el de la izquierda el grupo de pacientes con Leishmaniasis cutánea (esferas) y el de la derecha el grupo control (rombos). Por su parte, el eje de las y hace referencia a la primera variable canónica calculada por DFA para cada uno de los sujetos.

35 La figura 3 muestra los resultados obtenidos con el sensor S3 en el diagnóstico de la

Leishmaniasis cutánea, de acuerdo al ejemplo 2 incluido abajo (de acuerdo a la segunda realización del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención). El eje de las x muestra los grupos siendo, el de la izquierda el grupo de pacientes con Leishmaniasis cutánea (esferas) y el de la derecha el grupo control (rombos). Por su parte, el eje de las y hace referencia a la primera variable canónica calculada por DFA, para cada uno de los sujetos.

La figura 4 muestra la curva ROC (curva de teoría de detección de señales) obtenida para el sensor S3, de acuerdo al ejemplo 2. El eje de las x muestra la variable (1 - especificidad) y el eje de las y muestra la sensibilidad.

La figura 5 muestra una vista en perspectiva de un ejemplo de dispositivo (1) a utilizar en la segunda realización del método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de la presente invención. En la cara frontal, aproximadamente en el centro se observa un orificio de control (2) que conecta con la cámara de medidas (3) y que se utiliza para el control de las condiciones de vacío dentro de la cámara de medidas (3) de acuerdo a medios conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, para la conexión de un manómetro) (en caso de que no sea necesario realizar el vacío en la cámara de medidas, este orificio de control (2) puede estar ausente). A través de dicho orificio de control (2) resulta visible uno de los sensores (4) alojado en el interior de la cámara de medidas (3). En la cara superior del dispositivo (1), también aproximadamente en el centro de la misma, está dispuesto un acceso (5) para conexión que conecta o comunica con la cámara de medidas (3) y que, preferentemente, se utiliza para la conexión eléctrica de los sensores. Esta estructura de acceso para conexión alternativamente o adicionalmente podría encontrarse en la cara inferior del dispositivo (1). En el caso de que el dispositivo (1) comprenda un acceso (5) para conexión en la cara superior y un acceso para conexión en la cara inferior del dispositivo (1), ambas estructuras, se podrían utilizar de forma intercambiable para la conexión eléctrica de los sensores. Finalmente, en la cara lateral del dispositivo (1) que resulta visible en esta vista (cara lateral derecha), también aproximadamente en el centro de la misma, encontramos un primer racor de conexión (6) que conecta o comunica con la cámara de medidas (3). En la cara lateral que no resulta visible en esta vista se encuentra la misma estructura (un segundo racor de conexión (7), figura 6). Ambos, el primer racor de conexión (6) y el segundo racor de conexión (7), se pueden utilizar de forma intercambiable para la introducción de la muestra de exhalado y para realizar el vacío en la cámara de medidas

(3) antes de cada medida; o para evacuar la muestra de exhalado de la cámara de medidas (3).

5 La figura 6 muestra una vista en planta del dispositivo (1) mostrado en la figura 5. En esta figura resultan visibles el acceso para conexión (5) localizado en la cara superior del dispositivo (1); el primer racor de conexión (6), localizado en la cara lateral derecha del dispositivo (1) y el segundo racor de conexión (7) localizado en la cara lateral izquierda del dispositivo (1).

10 La figura 7 muestra una vista en perspectiva del dispositivo (1) mostrado en la figura 5, de acuerdo a la sección A-A indicada en la figura 6. En esta figura resultan visibles el acceso (5) para conexión localizado en la cara superior del dispositivo (1); y el primer racor de conexión (6) (el presente en la cara lateral del dispositivo (1) visible en esta vista). Por otro lado, en el interior del dispositivo (1) observamos la cámara de medidas  
 15 (3), en la cual encontramos los sensores (4), ocho en este caso y de los que resultan visibles 4 en la base y 2 en la parte superior de la cámara de medidas (3). Adicionalmente, cada uno de los sensores comprende dos electrodos (8). Finalmente, en la cara lateral izquierda de la cámara de medidas (3), aproximadamente en el centro de la misma, encontramos un segundo orificio (9) que se conecta o comunica con el  
 20 segundo racor de conexión (7) para, tal y como se ha indicado anteriormente, la introducción de la muestra de exhalado y realización del vacío en la cámara de medidas (3) antes de cada medida; o evacuar la muestra de exhalado de la cámara de medidas (3).

25 La figura 8 muestra una vista en perspectiva del dispositivo (1) mostrado en la figura 5, de acuerdo a la sección A-B indicada en la figura 6. En esta figura resulta visible el acceso para conexión (5) localizado en la cara superior del dispositivo (1). Por otro lado, en el interior del dispositivo (1) observamos la cámara de medidas (3), en la cual encontramos los sensores (4), ocho en este caso, y de los que resultan visibles 4 en la  
 30 base y 4 en la parte superior de la cámara de medidas (3). Adicionalmente, cada uno de los sensores (4) comprende dos electrodos (8). En la cara lateral izquierda de la cámara de medidas (3), aproximadamente en el centro de la misma, encontramos el segundo orificio (9) que se conecta o comunica con el segundo racor de conexión (7) para, tal y como se ha indicado anteriormente, la introducción de la muestra de exhalado  
 35 y realización del vacío en la cámara de medidas (3) antes de cada medida; o evacuar la

muestra de exhalado de la cámara de medidas (3). Finalmente, en esta figura también resultan visibles el primer racor de conexión (6) y en la cara lateral derecha de la cámara de medidas (3), aproximadamente en el centro de la misma, encontramos un primer orificio (10) que se conecta o comunica con el primer racor de conexión (6) para, tal y como se ha indicado anteriormente, la introducción de la muestra de exhalado y realización del vacío en la cámara de medidas (3) antes de cada medida; o evacuar la muestra de exhalado de la cámara de medidas (3).

Pese a que el dispositivo (1) mostrado en las figuras 5 a 8 comprende 8 sensores, ello únicamente resulta ilustrativo o ejemplificativo. Un experto en la materia adaptará al número de sensores presentes o utilizados en función de las diferentes realizaciones explicadas anteriormente y de los ejemplos incluidos a continuación.

### Ejemplos

15

Ejemplo 1. Diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea de acuerdo a una primera realización del método de la presente invención.

Se recogieron muestras de aliento o exhalado de un grupo de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis cutánea (n=28) y de un grupo de personas sin Leishmaniasis cutánea, que formaron el grupo de control (n=32). Las muestras fueron recogidas en los Hospitales Charles Nicole, Gafsa y Ben Arous de Túnez. Los dos grupos (Leishmaniasis cutánea y Control) fueron, en la medida de lo posible, pareados por edad y género.

25 Las muestras de exhalado fueron recogidas con un dispositivo inerte homologado Bio-VOC (Markes International Ltd., Reino Unido).

A continuación, el exhalado fue transferido a unos tubos preconcentradores de compuestos orgánicos volátiles con material absorbente Tenax TA (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos). Los tubos fueron, entonces, guardados en una nevera a 4°C hasta su análisis.

Las muestras, en este caso, fueron analizadas por GC/Q-TOF, estando dicho GC/Q-TOF configurado para funcionar de acuerdo a los siguientes parámetros; se utilizó una columna cromatográfica HP-5MSI (Agilent Technologies Spain S.L., Madrid, España).

Las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes: tiempo de desorción: 1 minuto; temperatura de desorción: 250°C. Los parámetros del horno fueron los siguientes: temperatura inicial: 50°C; rampa de 10°C/minuto hasta llegar a 155°C; rampa de 20°C/minuto hasta llegar a 270°C; 10 minutos a 270°C. La ionización se llevó a cabo por medio de impacto electrónico (IE), con una energía de los electrones de 70 eV y una temperatura de 230°C. El cromatograma se adquirió para compuestos con masa/carga que van desde 35 hasta 400, a una tasa de muestreo de 5 espectros/segundo. La deconvolución del cromatograma se llevó a cabo utilizando el software Unknown Analysis, ejecutado en modo automático, con el factor de similitud mínimo fijado en 70. La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a la librería de espectros de masas NIST14.

Para ello, los tubos preconcentradores con las muestras de exhalado mencionados anteriormente fueron cortados y el material absorbente fue transferido a viales de vidrio de 20 mL con tapón con septum. Dichos viales fueron calentados introduciéndolos 20 minutos en un baño de aceite sobre una placa calefactora calentada a 100°C. Esto permitió la desorción térmica de los compuestos volátiles de las muestras de exhalado atrapados en el material absorbente. Al desorberse, dichos compuestos orgánicos volátiles formaron un espacio de cabeza encima del material absorbente, dentro de los diferentes tubos de vidrio.

Se utilizó la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME, por sus siglas en inglés) con fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano) para capturar y concentrar los compuestos orgánicos volátiles del exhalado liberados del material absorbente e introducirlos en el GC/Q-TOF para proceder a su análisis químico en las condiciones indicadas anteriormente. Para ello la fibra de SPME se introdujo en el espacio de cabeza formado dentro del vial pinchando a través del septum del tapón del vial, donde se dejó durante 30 minutos, estando en todo este momento el vial calentado a 100°C en el baño de aceite encima de la placa calefactora calentada a 100°C.

En el presente caso se analizaron una serie de compuestos orgánicos volátiles útiles para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea (ver tabla 3). Dichos compuestos se hallaron en concentraciones estadísticamente diferentes entre los dos grupos aplicando el t-test con el valor de  $\alpha = 0,05$  (correspondiente al nivel de confianza de 95%).

Tabla 3. Listado de compuestos orgánicos volátiles analizados y sus características en GC/Q-TOF.

Compuesto orgánicos volátil	Compuesto	Número CAS	Masa/carga (m/z)	Tiempo de retención (min)	Valor p
COV 01	2,2,4-trimetil pentano	540-84-1	57,05	4,348	0,028
COV 02	4-metil-2-etil-1-pentanol	106-67-2	67,05	4,899	0,042
COV 03	metilvinil cetona	78-94-4	43,05	5,279	0,015
COV 04	nonano	1184-2	43,05	5,995	0,02
COV 05	2,3,5-trimetil hexano	1069-53-0	85,01	6,526	0,012
COV 06	Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato	1139-17-9	81,06	9,50	0,001
COV 07	octano	111-65-9	57,05	9,749	0,008
COV 08	3-etil-3-metilpentano	17302-01-1	71,06	10,079	0,01
COV 09	2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol	22459-10-5	67,05	10,861	0,03

- 5 En la figura 1 se observa representado el área bajo el pico cromatográfico obtenida para cada uno de los COVs o marcadores mencionados en la tabla 3 tanto para el grupo de control como para el grupo de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis cutánea. Para todos marcadores se observa un incremento del área bajo el pico cromatográfico en el grupo de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis cutánea en comparación con el grupo de control.
- 10

Se utilizaron las áreas cromatográficas de los compuestos arriba indicados para la construcción de modelos de reconocimiento de patrones, y se aplicó el DFA para entrenar el modelo. Se construyeron diversos modelos con diversas combinaciones de compuestos orgánicos volátiles, cuya tasa de acierto, así como los valores de sensibilidad, especificidad, verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), estimados mediante la validación cruzada dejando uno fuera (o “leave-one-out”), aparecen resumidos en la tabla 4.

15

Tabla 4. Combinaciones de compuestos orgánicos volátiles y su potencial diagnóstico. En esta tabla VP significa Verdaderos Positivos; VN significa Verdaderos Negativos; FP significa Falsos Positivos; y FN significa Falsos Negativos.

Número de combinación	Combinación de compuestos orgánicos volátiles	Tasa de acierto (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VP	VN	FP	FN
1	COV 03, COV 06	80	71,4	87,5	20	28	4	8
2	COV 01, COV 06, COV 07	80	75	84,5	21	27	5	7
3	COV 01, COV 02, COV 06, COV 07	78,3	71,4	84,4	20	27	5	8
4	COV 01, COV 02, COV 03, COV 06, COV 07	76,7	71,4	81,3	20	26	6	8
5	COV 01, COV 02, COV 05, COV 06, COV 07, COV 09	75	67,9	81,3	19	26	6	9
6	COV 01, COV 02, COV 03, COV 05, COV 06, COV 08, COV 09	73,3	71,4	75	20	24	8	8
7	COV 01, COV 02, COV 04, COV 05, COV 06, COV 08, COV 09	73,3	71,4	75	20	24	8	8
8	COV 01, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 08, COV 09	73,3	71,4	75	20	24	8	8
9	COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 08, COV 09	71,7	71,4	71,9	20	23	9	8
10	de COV 01 a COV 09	66,7	57,1	75	16	24	8	12

Tal como se deriva de la tabla 4, las diferentes combinaciones probadas mostraron ser útiles en el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea, permitiendo discernir de forma efectiva entre pacientes con Leishmaniasis cutánea e individuos sanos en relación con dicha enfermedad (grupo control). La mejor tasa de acierto que se obtuvo para las  
5 diferentes combinaciones probadas fue del 80 % (ver combinaciones 1 y 2). Dichas combinaciones 1 y 2 son las que muestran una combinación más favorable de sensibilidad y especificidad, y una mejor tasa de acierto.

Adicionalmente, en la figura 2 se muestran los resultados obtenidos para la combinación  
10 2 (por análisis mediante DFA), pudiéndose observar en dicha figura la capacidad de dicha combinación a la hora de discernir entre pacientes con Leishmaniasis cutánea y grupo control.

Por tanto, el método diagnóstico de acuerdo a una primera realización de la presente  
15 invención es útil para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea proporcionando un método rápido y eficaz que permite resolver los problemas presentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente y que utiliza una muestra que se obtiene por métodos no invasivos.

20 Ejemplo 2. Diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea de acuerdo a una segunda realización del método de la presente invención.

Se recogieron muestras de aliento de un grupo de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis cutánea (n=28) y de un grupo de personas sin Leishmaniasis cutánea,  
25 que formaron el grupo de control (n=28). Las muestras fueron recogidas en los Hospitales Charles Nicole, Gafsa y Ben Arous de Túnez. Los dos grupos (Leishmaniasis cutánea y Control) fueron, en la medida de lo posible, pareados por edad y género.

Las muestras de exhalado fueron recogidas con un dispositivo inerte homologado Bio-  
30 VOC (Markes International Ltd., Reino Unido).

A continuación, el exhalado fue transferido a unos tubos preconcentradores de compuestos orgánicos volátiles con material absorbente Tenax TA (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos). Los tubos fueron, entonces, guardados en una nevera a  
35 4°C hasta su análisis.

En este caso las muestras recogidas fueron analizadas por medio de sensores químicos de gases.

5 Dichos sensores fueron fabricados sobre silicio mediante técnicas de microprocesado. En este sentido, se definieron dos electrodos de oro paralelos, con una separación de 15  $\mu\text{m}$  en la región del área activa del sensor. En esta región se depositó el material activo del sensor. Como material activo se depositaron nanopartículas de cobre (en adelante, CuNP), nanopartículas de oro (en adelante, AuNP) y/o nanopartículas de platino (en adelante, PtNP) funcionalizadas con diversos compuestos orgánicos (ver  
10 tabla 5). Dicha fabricación, funcionalización y/o deposición se llevó a cabo de acuerdo con lo indicado en el documento de publicación de la solicitud de patente española ES2566067A1.

15 Tabla 5. Características de los diferentes sensores probados.

Sensor	Nanomaterial	Compuesto orgánico de funcionalización	Resistencia ( $M\Omega$ )
S1	AuNP	1-dodecanotiol	0,7
S2	CuNP	11-mercaptoundecanol	2,3
S3	CuNP	2-mercaptobenzoxazol	0,6
S4	AuNP	2-mercaptobenzoxazol	5,8
S5	PtNP	1-dodecanotiol	7,8
S6	CuNP	ácido 11-mercaptoundecanoico	4,5

Los sensores fueron, entonces, colocados en una cámara de medidas cerrada herméticamente (73,5 mL de volumen), hecha de acero inoxidable (en el presente caso, con unas dimensiones de: 70x35x30  $\text{mm}^3$ ) fabricada para este propósito, provista de  
20 dos orificios: uno para la introducción de la muestra de exhalado y para realizar el vacío en la cámara de medidas antes de cada medida (con una bomba eléctrica conectada), y el otro para evacuar la muestra de exhalado.

Para analizar el exhalado, los tubos preconcentradores con las muestras de exhalado  
25 mencionados anteriormente fueron cortados y el material absorbente fue transferido a viales de vidrio de 20 mL con tapón con septum que fueron sellados. Dichos viales fueron calentados introduciéndolos 10 minutos en un horno a 270°C. Esto permitió la desorción térmica de los compuestos orgánicos volátiles de las muestras de exhalado atrapados en el material absorbente. Dichos compuestos volátiles se quedaron en el

espacio de cabeza de los diferentes tubos y por medio de una jeringa para gases de 10 mL, 10 mL de dicho espacio de cabeza fue extraído de los viales e inyectado en la cámara de medidas que alberga los sensores químicos de gases. Con anterioridad a la introducción de las muestras, se realizó un vacío de 600 mbar en la cámara de medidas  
5 mediante bomba eléctrica externa.

Los sensores fueron operados de forma secuencial. Cada uno fue alimentado o tratado de la siguiente manera:

- 10 - 5 minutos de vacío. Durante esta etapa cada sensor fue alimentado de forma sucesiva a una tensión continua de 8 V durante 10 segundos, y posteriormente se dejó inactivo (sin alimentación de tensión) durante 70 segundos. Este ciclo de activo (alimentación con tensión)-inactivo mencionado anteriormente se llevó a cabo 4 veces, para cada sensor.
- 15 - Realización de las medidas: 5 minutos de exposición a los compuestos orgánicos volátiles de la muestra de exhalado inyectados mediante la jeringa mencionada anteriormente. Durante esta etapa cada sensor fue alimentado de forma sucesiva a una tensión continua de 8 V durante 10 segundos, seguido de 70 segundos de inactividad. Durante el tiempo indicado de 5 minutos de exposición  
20 se efectuaron 4 de los mencionados ciclos de actividad (alimentación de tensión) – inactividad, para cada sensor.
- Tras la medida de cada muestra, la cámara de medidas fue limpiada con aire sintético (a un caudal de 2 L/min) durante 30 minutos. Durante el procedimiento de limpiado, los sensores fueron alimentados, de forma sucesiva y de manera  
25 secuencial durante 10 segundos a 10 V de tensión continua, seguido de 70 segundos de inactividad. Durante todo el tiempo indicado anteriormente de 30 minutos de limpieza se repitieron los mencionados ciclos de actividad (alimentación de tensión) – inactividad para cada sensor. Esta forma de proceder, aseguró el limpiado de las superficies de los sensores y la purga de la  
30 cámara de medidas.

Se extrajeron los siguientes tres parámetros de la respuesta de cada sensor a cada muestra analizada, durante el primer ciclo de actividad del sensor en la etapa de exposición a los compuestos orgánicos volátiles de la muestra de exhalado (la respuesta

de los sensores fue similar durante los 4 ciclos, con lo que se seleccionó el primer ciclo con el fin de disminuir la carga computacional):

- Parámetro 1 (P1): Promedio de la corriente continua obtenida durante 1,22 segundos en la mitad del periodo de exposición del sensor a la muestra de exhalado;
- Parámetro 2 (P2): Promedio de la corriente continua obtenida durante los últimos 1,22 segundos de exposición del sensor a la muestra de exhalado;
- Parámetro 3 (P3): Área bajo la curva de respuesta durante los 1,78 últimos segundos de exposición del sensor a la muestra de exhalado;

Para cada sensor se construyó un modelo de reconocimiento de patrones con los tres parámetros extraídos de las respuestas de dicho sensor, y se aplicó el algoritmo DFA para entrenar los modelos. La tasa de acierto, así como los valores de sensibilidad y especificidad, fueron estimados mediante validación cruzada dejando uno fuera (o "leave-one-out").

Los resultados obtenidos para los diferentes sensores estudiados aparecen resumidos en la tabla 6.

Tabla 6. Potencial diagnóstico de cada uno de los sensores analizados. En esta tabla VP significa Verdaderos Positivos; VN significa Verdaderos Negativos; FP significa Falsos Positivos; y FN significa Falsos Negativos.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
<b>VP</b>	21	22	28	21	16	25
<b>VN</b>	23	23	28	20	25	23
<b>FP</b>	5	5	0	8	3	5
<b>FN</b>	7	6	0	7	12	3
<b>Tasa de acierto (%)</b>	78,6	80,4	100	73,2	73,2	85,7
<b>Especificidad (%)</b>	82,1	82,1	100	71,4	89,3	82,1
<b>Sensibilidad (%)</b>	75	78,6	100	75	57,1	89,3

Tal como se desprende de la tabla 6, las tasas de acierto varían en función del sensor y llegaron al 100% en el caso de S3 (para los resultados obtenidos con dicho sensor S3, ver también las figuras 3 y 4). Utilizando la combinación de las respuestas de los 6

sensores mencionados en la tabla 5, la tasa de acierto fue de 98,2 %, la sensibilidad fue de 96,4% y la especificidad fue de 100%.

5 Por tanto, el método diagnóstico de acuerdo a una segunda realización de la presente invención es útil para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea proporcionando un método sencillo, rápido y eficaz que permite resolver los problemas presentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente. Adicionalmente, resulta destacable en el caso de la segunda realización de la presente invención (correspondiente al ejemplo 2) que se trata de un método de diagnóstico de Leishmaniasis cutánea muy  
10 sencillo de realizar, pudiendo ser realizado sin necesidad de conocimiento especializado (ni asistencia médica), en casa del paciente, en farmacias o en centros de asistencia primaria. También resultan sorprendentes los resultados obtenidos para el sensor S3, que ha mostrado ser muy superior al resto de sensores permitiendo el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea, en la población de estudio, con una tasa de acierto del 100%,  
15 una especificidad del 100% y una sensibilidad del 100%.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea caracterizado porque comprende la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en una muestra de exhalado de un sujeto.
2. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 1, caracterizado porque el sujeto es un humano.
3. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el método es un método in vitro.
4. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el al menos un compuesto orgánico volátil es 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; metilvinil cetona; nonano; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; octano; 3-etil-3-metilpentano; 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol; o combinaciones de los mismos.
5. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 4, caracterizado porque la combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:
- metilvinil cetona y Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato.
  - 2,2,4-trimetil pentano, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato y octano.
  - 2,2,4-trimetil pentano, 4-metil-2-etil-1-pentanol, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato y octano.
  - 2,2,4-trimetil pentano, 4-metil-2-etil-1-pentanol, metilvinil cetona, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato y octano.
  - 2,2,4-trimetil pentano, 4-metil-2-etil-1-pentanol, 2,3,5-trimetil hexano, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato, octano y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
  - 2,2,4-trimetil pentano, 4-metil-2-etil-1-pentanol, metilvinil cetona, 2,3,5-trimetil hexano, 3-etil-3-metilpentano y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.

- 2,2,4-trimetil pentano, 4-metil-2-etil-1-pentanol, nonano, 2,3,5-trimetil hexano, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato, 3-etil-3-metilpentano y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
  - 5 - 2,2,4-trimetil pentano, metilvinil cetona, nonano, 2,3,5-trimetil hexano, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato, 3-etil-3-metilpentano y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
  - 2,2,4-trimetil pentano, 4-metil-2-etil-1-pentanol, metilvinil cetona, nonano, 2,3,5-trimetil hexano, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato, 3-etil-3-metilpentano y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
  - 10 - 2,2,4-trimetil pentano, 4-metil-2-etil-1-pentanol, metilvinil cetona, nonano, 2,3,5-trimetil hexano, Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato, octano, 3-etil-3-metilpentano y 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol.
6. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 5,
- 15 caracterizado porque la combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:
- metilvinil cetona y Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato.
  - 20 - 2,2,4-trimetil pentano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; y octano.
7. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según cualquiera de las
- 25 reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la detección del al menos un compuesto orgánico volátil se lleva a cabo por medio de cromatografía de GC-MS, GC/Q-TOF, GCxGC/MS y/o PTR-MS.
8. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 7,
- 30 caracterizado porque la detección del al menos un compuesto orgánico volátil se lleva a cabo por medio de GC/Q-TOF.
9. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 8,
- 35 caracterizado porque mediante GC/Q-TOF se mide el área bajo el pico cromatográfico del al menos un compuesto orgánico volátil.

10. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la muestra de exhalado se analiza mediante un dispositivo que comprende al menos un sensor que, a su vez, comprende al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles.
- 5
11. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 10, caracterizado porque la detección de al menos un compuesto orgánico volátil comprende las etapas de:
- 10
- exposición del al menos un sensor a la muestra de exhalado;
  - y detección del cambio en al menos una de las propiedades del al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles.
- 15
12. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 10 ó 11, caracterizado porque el al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles comprende al menos un nanomaterial funcionalizado y/o recubierto por al menos un compuesto orgánico.
- 20
13. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 12, caracterizado porque, el nanomaterial funcionalizado y/o recubierto por al menos un compuesto orgánico está dispuesto en forma de monocapa en el al menos un sensor.
- 25
14. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 13, caracterizado porque el al menos un sensor comprende:
- 30
- nanopartículas de Au funcionalizadas con 1-dodecanotiol;
  - nanopartículas de Au funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol;
  - nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol;
  - nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico;
  - nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol;
- 35
- nanopartículas de Pt funcionalizadas con 1-dodecanotiol;
  - o combinaciones de las mismas.

15. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado porque el al menos un sensor es un sensor.

5

16. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 15, caracterizado porque el sensor comprende:

- nanopartículas de Au funcionalizadas con 1-dodecanotiol;
- 10 - nanopartículas de Au funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol;
- nanopartículas de Pt funcionalizadas con 1-dodecanotiol;
- 15 - o combinaciones de las mismas.

17. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 16, caracterizado porque el sensor comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol.

20

18. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado porque el al menos un sensor son seis sensores.

25

19. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 18, caracterizado porque los seis sensores son: un sensor que comprende nanopartículas de Au funcionalizadas con 1-dodecanotiol; un sensor que comprende nanopartículas de Au funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol; un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol; un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico; un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol; y un sensor que comprende nanopartículas de Pt funcionalizadas con 1-dodecanotiol.

30  
35

- 5
20. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque comprende una etapa de análisis de datos en la que se utiliza un algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones.
- 10
21. Método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según la reivindicación 20, caracterizado porque el algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones es DFA.
- 15
22. Test o kit para llevar a cabo un método para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
- 20
23. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.
- 25
24. Uso según la reivindicación 23, caracterizado porque el al menos un compuesto orgánico volátil es 2,2,4-trimetil pentano; 4-metil-2-etil-1-pentanol; metilvinil cetona; nonano; 2,3,5-trimetil hexano; Hidroxi-2,4,6-trimetil-5-(3-metil-2-butenil)ciclohexil)metil acetato; octano; 3-etil-3-metilpentano; 2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol; o combinaciones de los mismos.
- 25
25. Uso de una muestra de exhalado de un sujeto para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

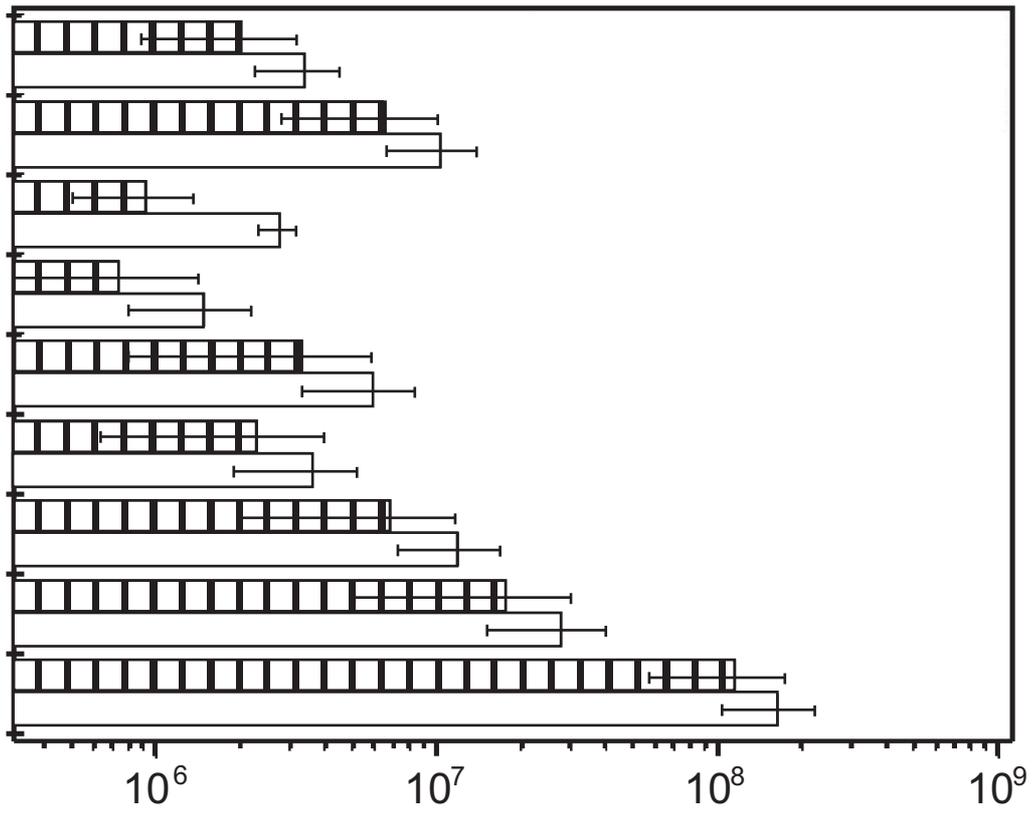


Fig. 1

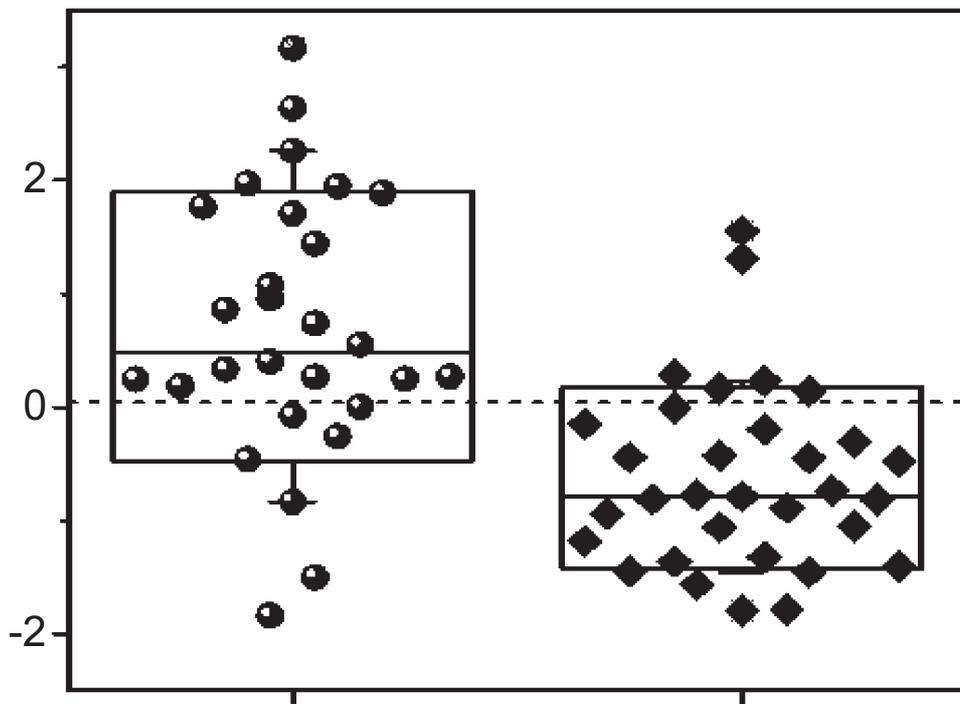


Fig. 2

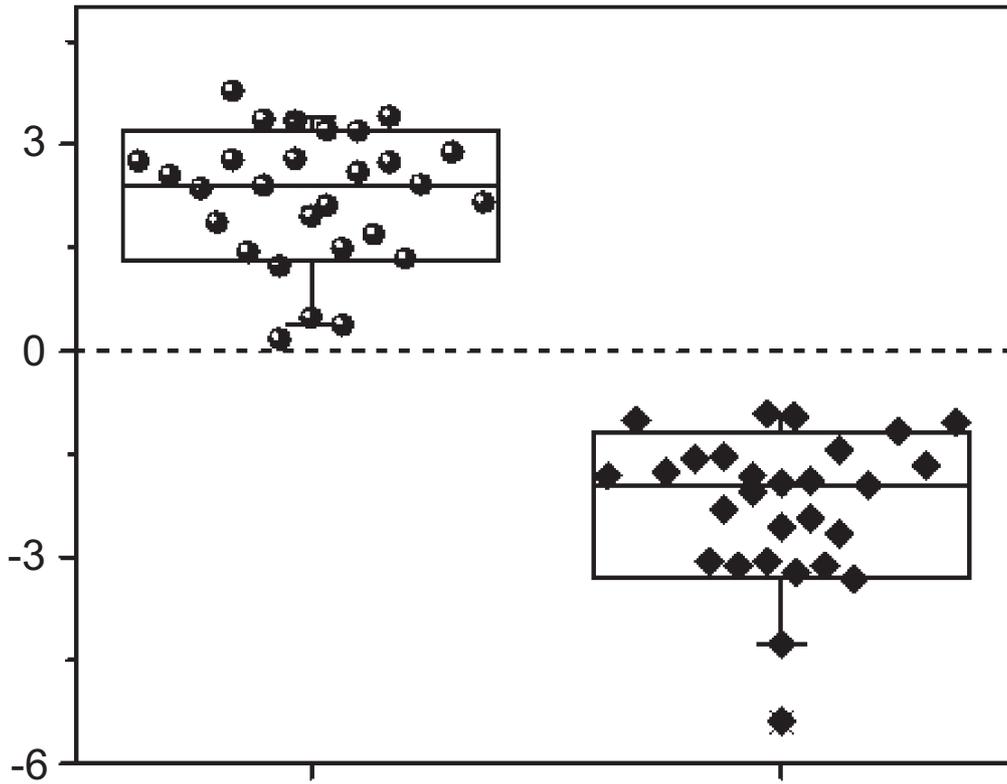


Fig. 3

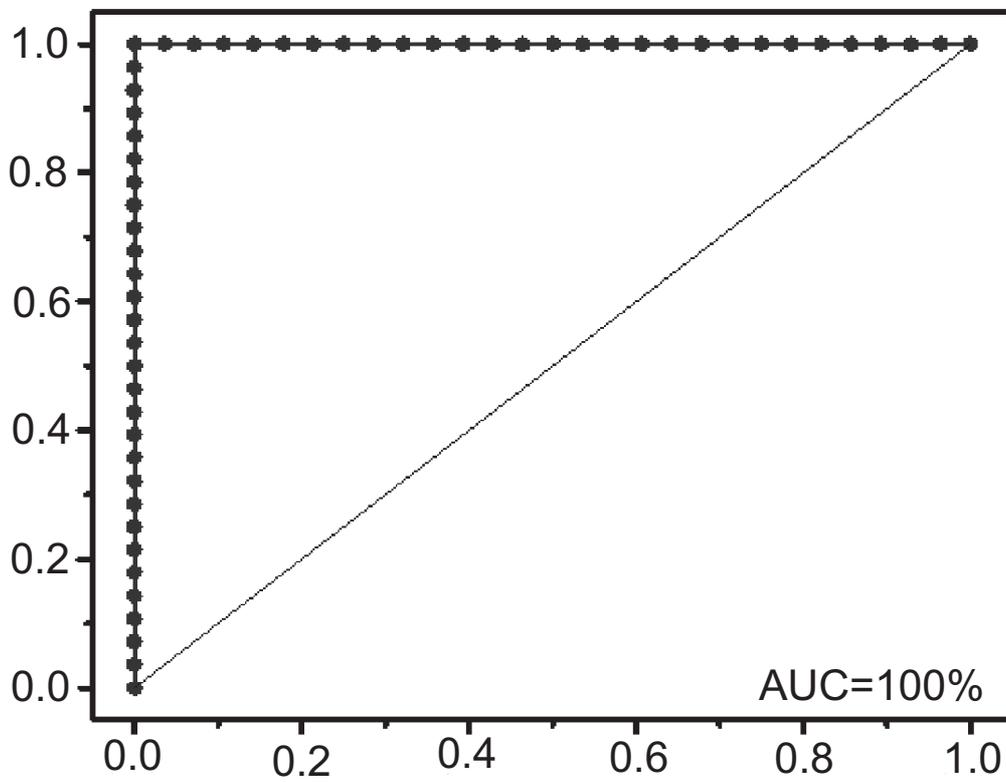
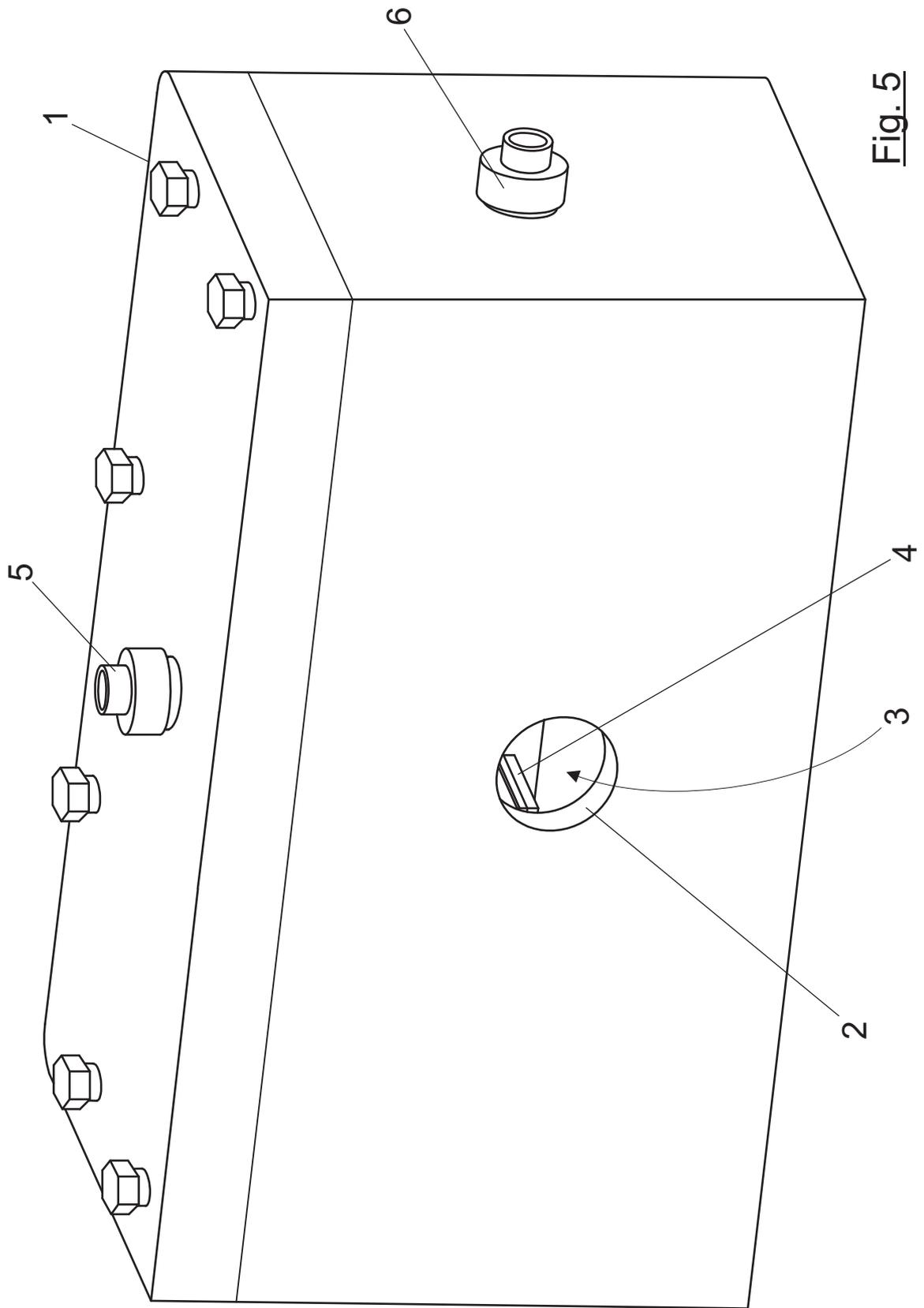


Fig. 4



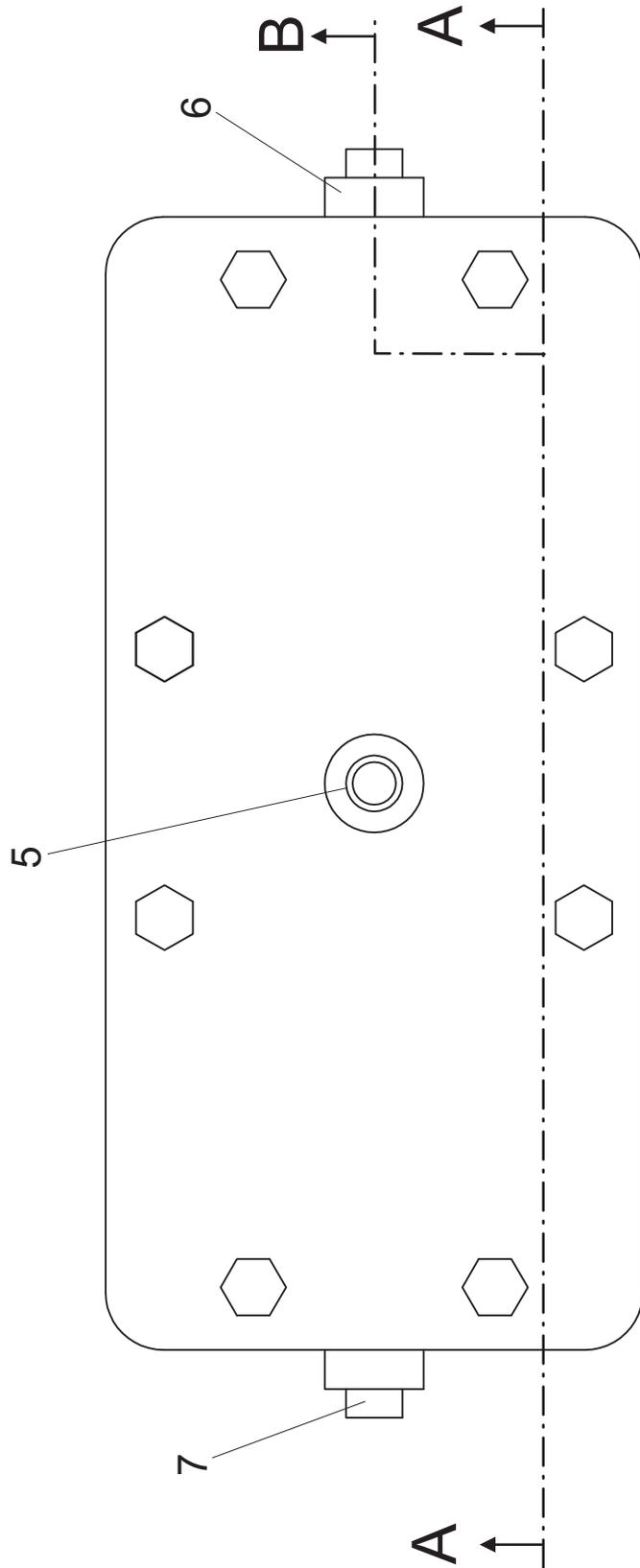
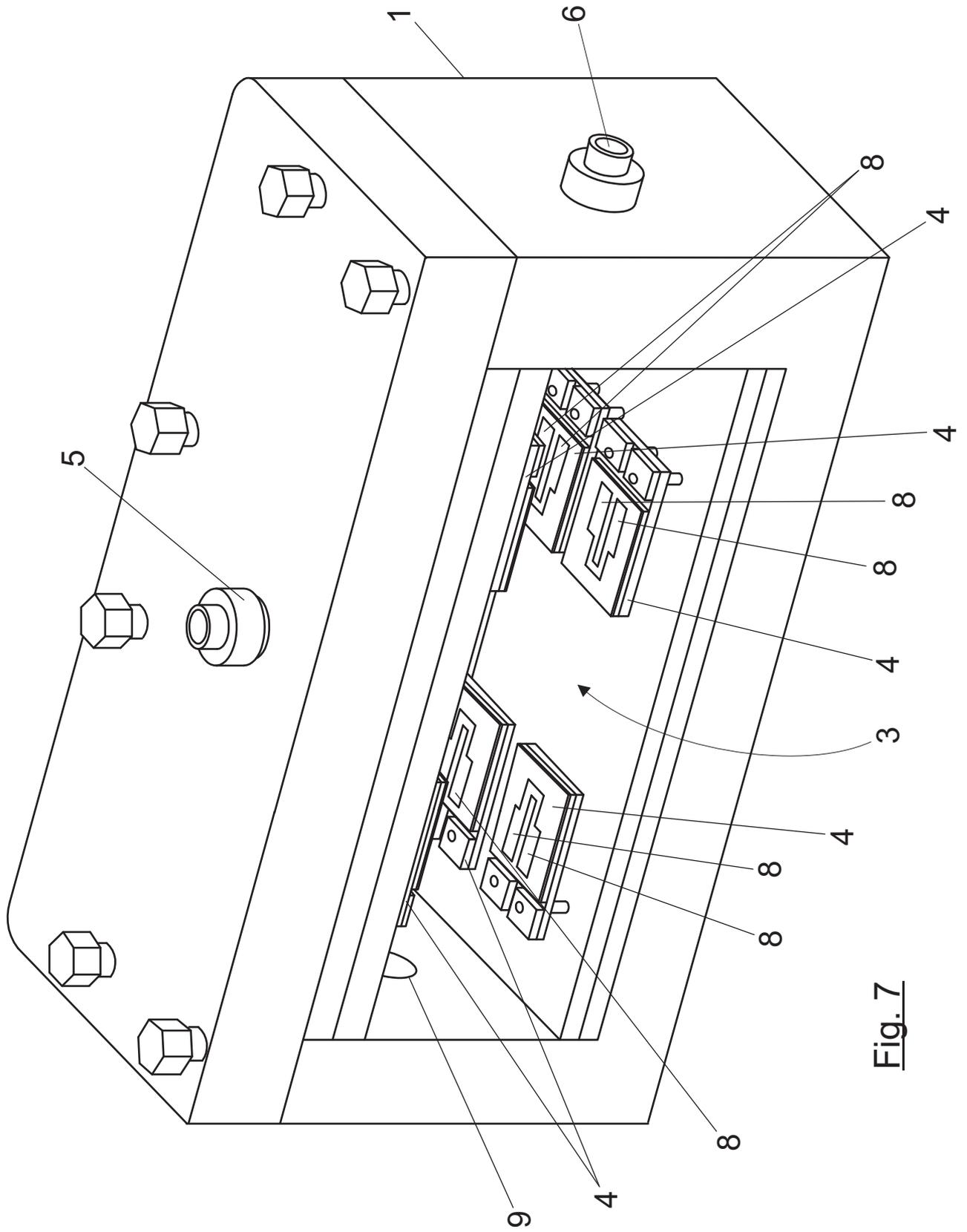


Fig. 6



**Fig. 7**

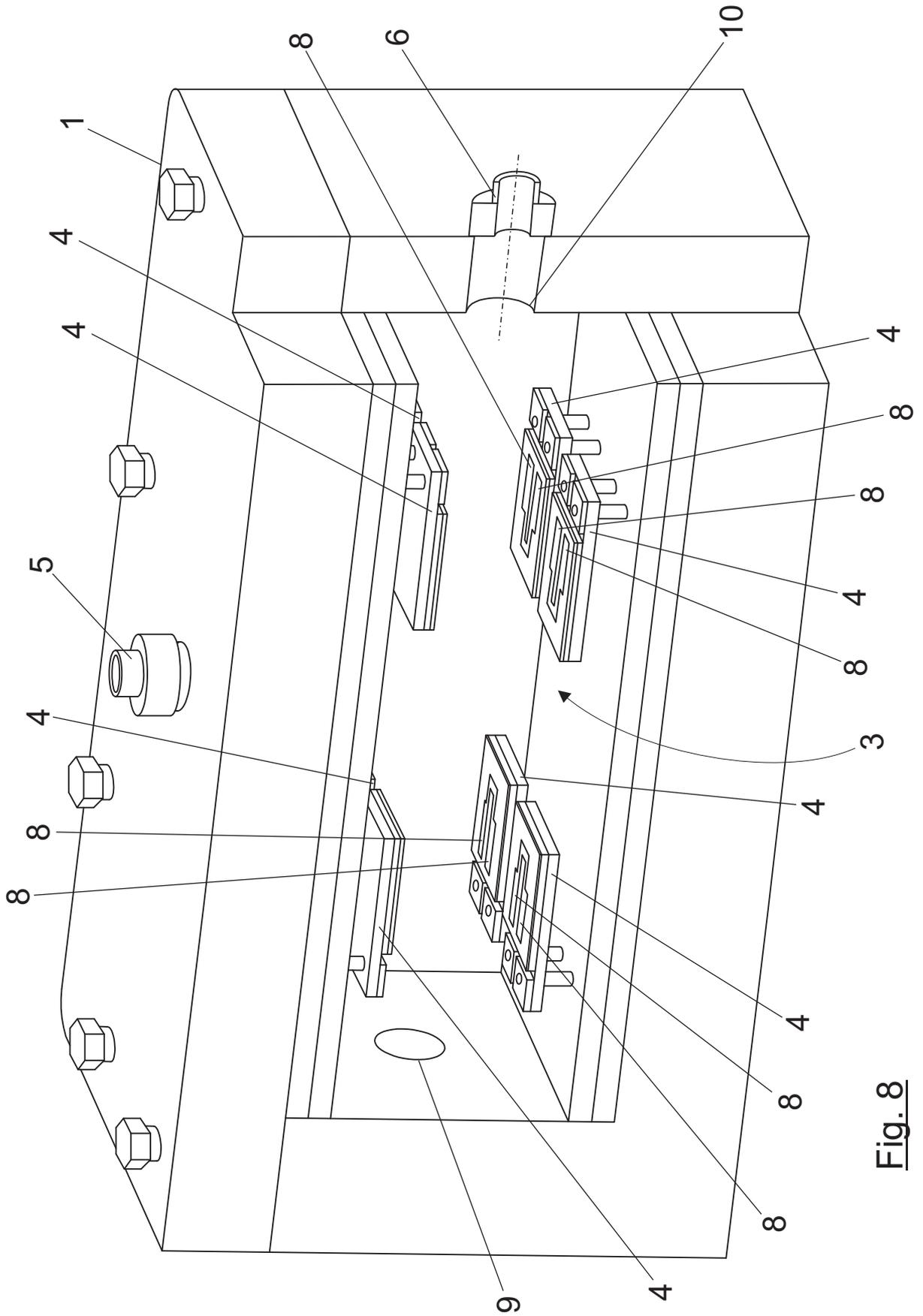


Fig. 8



21 N.º solicitud: 201830379

22 Fecha de presentación de la solicitud: 18.04.2018

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: **G01N33/497** (2006.01)  
**G01N30/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 3190412 A1 (UNIV TOKYO) 12/07/2017, párrafos [0015]-[0018].	1-25
A	NZELU CHUKWUNONSO O <i>et al.</i> A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. ACTA TROPICA, 20151026 ELSEVIER SCIENCE BV., AMSTERDAM, NL. Johansen Maria V; Dorny Pierre; Welburn Sue, 26/10/2015, Vol. 153, Páginas 116 - 119, ISSN 0001-706X, <DOI: doi:10.1016/j.actatropica.2015.10.013>	1-25
A	US 2017045495 A1 (TROWELL STEPHEN <i>et al.</i> ) 16/02/2017, párrafos [0008], [0017], [0035], [0083], [0115]-[0118], [0131]; ejemplos.	1-25
A	EP 3101422 A1 (TECHNION RES & DEV FOUNDATION TECHNION RES & DEVELOPMENT FOUNDATION LTD) 07/12/2016, párrafos [0014]-[0035].	1-25
A	MAGALHAES-JUNIOR JAIRO TORRES <i>et al.</i> Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 20140830 SPRINGER, DE. Turner Charlotta; Bergquist Jonas, 30/08/2014, Vol. 406, Páginas 6691 - 6700, ISSN 1618-2642, <DOI: doi:10.1007/s00216-014-8103-2>	1-25
A	DE OLIVEIRA L S <i>et al.</i> Headspace solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: A new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, 20081115 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Tsikas Dimitrios; Theodoridis Georgios, 15/11/2008, Vol. 875, Páginas 392 - 398, ISSN 1570-0232, <DOI: doi:10.1016/j.jchromb.2008.09.028>	1-25

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
18.02.2019

Examinador  
N. Vera Gutierrez

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP, PATENW