

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 679**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61B 5/15 (2006.01)
A61B 5/157 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2016 PCT/NL2016/050002**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16111619**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2016 E 16720577 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3243076**

54 Título: **Procedimientos de detección de un marcador de tuberculosis activa**

30 Prioridad:

05.01.2015 NL 2014085
02.10.2015 NL 2015553

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2020

73 Titular/es:

TOMORROWS IP LIMITED (50.0%)
805-6 Prosperity Millenia Plaza, 663 King's Road,
North Point
Hong Kong, CN y
KEI INTERNATIONAL LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

CASTROP, JOHANNES, THEODORUS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 755 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de detección de un marcador de tuberculosis activa

La presente invención se refiere a procedimientos de detección de un marcador de la tuberculosis activa, un dispositivo portátil para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa. La presente invención se refiere adicionalmente a un sistema para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa, un procedimiento para el pretratamiento de una muestra extraída de un ser humano o un animal sospechosos de tener tuberculosis activa, un sistema para el pretratamiento de una muestra extraída de un ser humano o un animal sospechoso de tener una tuberculosis activa y kits para su uso en dichos procedimientos.

10 Introducción

El *Mycobacterium tuberculosis* es una especie bacteriana patógena de la familia *Mycobacteriaceae* y el agente causal de la mayoría de los casos de tuberculosis (TB).

Nueve millones de personas enfermaron de TB en 2013, incluyendo 1,5 millones de casos entre las personas con VIH. En 2013, 1,5 millones de personas murieron de TB, incluyendo 360000 entre las personas que eran positivas al VIH. La TB es una de las tres mayores causas de muerte entre las mujeres en el mundo, murieron 510000 mujeres de TB en 2103. De las muertes por TB entre las personas positivas al VIH, el 50 % eran mujeres. Al menos 550000 niños enfermaron de TB y se estima que 80000 niños negativos al VIH murieron de TB en 2013. Globalmente, se estima que en 2013 480000 personas desarrollaron una TB resistente a multifármacos (MDR-TB) y se estimó que hubo 210000 muertos de MDR-TB. Se ha publicado al menos un caso de TB extensamente resistente a fármacos (XDR-TB) en 100 países a finales de 2013. De media, se ha estimado que el 9 % de casos de MDR-TB es XDR-TB.

Por lo tanto, es de la mayor importancia que haya una manera rápida y fiable de diagnóstico de la tuberculosis.

Se han desarrollado varios procedimientos de diagnóstico de la tuberculosis, pero todos los procedimientos tienen sus desventajas. El diagnóstico de la tuberculosis activa basada simplemente en los signos y síntomas es difícil, así como el diagnóstico de la enfermedad en los inmunosuprimidos. El ensayo cutáneo de la TB (también llamado ensayo cutáneo de tuberculina Mantoux), los ensayos de TB en sangre (también llamados ensayos de liberación de interferón gamma o IGRA), y las radiografías de tórax (por rayos X), y los ensayos de la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (AFB) en un frotis de esputo, indican algunos de los individuos infectados en días. Un diagnóstico definitivo se hace mediante la identificación del *M. tuberculosis* en una muestra clínica (por ejemplo, esputo, pus, o una biopsia de tejido). Sin embargo, la dificultad del procedimiento de cultivo para este organismo de crecimiento lento puede durar de dos a seis semanas para el cultivo de sangre o esputo.

Los seres humanos o animales infectados con el *M. tuberculosis* normalmente producen anticuerpos dirigidos contra el *Mycobacterium*. La presencia de estos anticuerpos en una muestra tomada de individuos infectados indica la infección. El documento WO 2005/116654 describe un procedimiento basado en este principio y desvela la detección de un marcador para la tuberculosis activa. El procedimiento del documento WO 2005/116654 implica la obtención de una primera, segunda y tercera muestras de un sujeto sospechoso de tener tuberculosis activa, la dilución de la primera muestra y la exposición de parte de ella a un antígeno del ácido micólico inmovilizado en un vaso de ensayo y parte de ella a un agente micólico inmovilizado en un vaso de control. La segunda muestra se expone a liposomas que contienen antígeno del ácido micólico y la tercera muestra se expone a liposomas que no contienen los antígenos de ácido micólico. La segunda muestra se añade al vaso de ensayo y la tercera muestra al vaso de control y se detecta la unión de los anticuerpos al ácido micólico y el antígeno tanto en el vaso de ensayo como en el de control. Se compara el grado de unión entre los vasos de ensayo y de control y una menor unión en el vaso de ensayo es un indicador de la presencia de anticuerpos contra el antígeno del ácido micólico.

Se describe un desarrollo adicional en el documento WO 2013/186679, que desvela un procedimiento de detección de anticuerpos marcadores específicos de antígeno para el diagnóstico de la tuberculosis activa, incluyendo el procedimiento las etapas de: proporcionar una composición liposómica que presenta el antígeno que comprende liposomas que comprenden un lípido modificado con esterol y un componente lipídico de la pared celular micobacteriana purificado o un análogo o derivado del mismo; la inmovilización de los liposomas para producir antígenos de ácido micólico inmovilizados que comprenden el componente lipídico de la pared celular micobacteriana purificado o análogo o derivado del mismo; la obtención de una primera, una segunda y una tercera muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa, en el que cada muestra puede contener anticuerpos contra el antígeno, teniendo la primera muestra una concentración menor mediante dilución que la segunda y tercera muestras; la exposición de parte de la primera muestra a los antígenos del ácido micólico inmovilizados en un vaso de ensayo; la exposición de parte de la primera muestra a los antígenos del ácido micólico inmovilizados en un vaso de control; la exposición de la segunda muestra a la composición liposómica que presenta el antígeno proporcionada en la primera etapa; la exposición de la tercera muestra a los liposomas que no contienen el antígeno del ácido micólico; la adición de la segunda muestra, después de la exposición a la composición liposómica que contiene el antígeno del ácido micólico proporcionada en la primera etapa, al vaso de ensayo; la adición de la tercera muestra, después de la exposición a los liposomas que no contienen ácido micólico, al vaso de

control; la detección de la unión de los anticuerpos al antígeno del ácido micólico en ambos vasos de control y de ensayo en tiempo real; y la comparación del grado de extensión de unión entre los vasos de ensayo y de control, siendo una unión más débil en el vaso de ensayo un indicador de la presencia de anticuerpos contra el antígeno del ácido micólico en la muestra que indica la tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se origina la muestra.

Los procedimientos descritos en los documentos WO 2005/116654 y WO 2013/186679 proporcionan procedimientos fiables para el diagnóstico de la tuberculosis, pero tienen bastantes desventajas. Primero, los procedimientos descritos en los documentos WO 2005/116654 y WO 2013/186679 necesitan la provisión de varias muestras del mismo sujeto. Segundo, estos procedimientos necesitan varias etapas de dilución y varias etapas de transferencia de muestras a diferentes compartimentos no conectados, necesitando un conjunto grande y complicado de partes instrumentales. Tercero, estos procedimientos implican etapas distintas de incubación de la muestra y diluciones de la misma y posteriormente varias mediciones distintas. Por estas razones, los procedimientos de los documentos WO 2005/116654 y WO 2013/186679 son complicados y se tarda mucho. De hecho, el tiempo total desde la obtención de la muestra de un sujeto sospechoso de tener tuberculosis activa hasta la determinación de si el individuo está infectado o no con tuberculosis activa utilizando los procedimientos desvelados en los documentos WO 2005/116654 y WO 2013/186679 dura un tiempo estimado de al menos 2 horas por muestra. Además, debido a que los procedimientos anteriores necesitan un conjunto grande y complicado de partes instrumentales, dichos procedimientos pueden ser útiles en un entorno hospitalario, pero no en áreas carentes de hospitales y atención sanitaria bien desarrollada, por ejemplo, en países en desarrollo. Es en estos países en particular, donde la tuberculosis es más prevalente y donde se desea más un diagnóstico fiable y rápido.

Por lo tanto, la invención tiene el objetivo de proporcionar una manera para determinar si un individuo está infectado o no con una tuberculosis activa (por ejemplo, tuberculosis pulmonar o extrapulmonar) que sea rápido y fiable, y que se pueda llevar a cabo fuera de un entorno médico profesional, es decir, fuera de un hospital, por ejemplo, en la calle.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa en tiempo real como se define en la reivindicación 1.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa en un ensayo *de punto final* como se define en la reivindicación 5.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el pretratamiento de una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener una tuberculosis activa como se define en la reivindicación 11.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un dispositivo portátil como se define en la reivindicación 20.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un sistema para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa como se define en la reivindicación 29 y la reivindicación 35.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un sistema para el pretratamiento de una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener una tuberculosis activa como se define en las reivindicaciones 32 y 34.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a kits como se definen en las reivindicaciones 39 y 40.

Descripción de las figuras

La Fig. 1 describe una realización ejemplar del dispositivo de la invención.

La Fig. 2 describe una realización ejemplar del sistema de acuerdo con la reivindicación 32.

Descripción de la invención

El principio de la invención se basa en la observación del inventor de que se pueden detectar los anticuerpos contra derivados del ácido micólico en una muestra rápida y fiablemente si la muestra se pretrata de acuerdo con las etapas i)-v) de los procedimientos descritos posteriormente.

Procedimiento de detección en tiempo real

La presente invención se refiere en un aspecto a un procedimiento para la detección de anticuerpos contra derivados del ácido micólico, tal como anticuerpos de factores cordales o anticuerpos del ácido micólico (MA) en una muestra, en la que tiene lugar la detección en tiempo real.

Este procedimiento comprende las etapas de:

- i) proporcionar una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa;
- ii) poner en contacto dicha muestra con un esteroil lipídico;

- iii) obtener al menos dos fracciones de dicha muestra sea antes o después de su exposición a dicho esterol lipídico;
- iv) exponer la primera de dichas fracciones a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
- 5 v) exponer la segunda de dichas fracciones a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
- vi) exponer la fracción de muestra expuesta en la etapa iv) a un sustrato de ensayo que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico y exponer la fracción de muestra expuesta en la etapa v) a un sustrato de control que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;
- 10 vii) detectar la unión de anticuerpos al antígeno de la etapa vi) en tiempo real; y
- viii) comparar el grado o extensión de unión del anticuerpo entre los sustratos de ensayo y de control, siendo cualquier unión menor observada al sustrato de ensayo un indicador de la presencia de anticuerpos al antígeno en la muestra que indica tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se origina la muestra. Se hará referencia a este procedimiento a lo largo de la solicitud como el "procedimiento en tiempo real".
- 15 El procedimiento en tiempo real hace posible que las muestras, preferentemente muestras de sangre, se analicen de una manera fiable y rápida sin necesidad de transferir muestras desde y dentro de varios vasos. Las etapas de preincubación posteriores de la muestra con un esterol lipídico, seguida por el sometimiento de una fracción de la muestra a una etapa de preincubación con un antígeno derivado del ácido micólico para obtener una muestra de ensayo y otra fracción de la muestra a una preincubación sin el antígeno derivado del ácido micólico para obtener una muestra de control que da lugar a una muestra adecuada para la aplicación directa en la etapa de detección eventual que implica la unión de los antígenos de ácido micólico en la muestra pretratada a un sustrato de biosensor que lleva el ácido micólico. El sustrato de biosensor no necesita por lo tanto una preincubación o pretratamiento del sensor con una dilución de la muestra. En consecuencia, el procedimiento de la invención no necesita las etapas de varias diluciones y transferencias necesarias en los procedimientos de la técnica anterior.
- 20 Además, el procedimiento en tiempo real de la invención es ventajosamente adecuado para llevarlo a cabo mediante un dispositivo portátil, en particular mediante el dispositivo definido posteriormente. Esto hace posible determinar si un individuo está infectado o no con tuberculosis activa (por ejemplo, tuberculosis pulmonar o extrapulmonar) de una manera rápida y fiable, permitiendo la detección de tuberculosis en menos de 15 a 25 minutos. Además, el procedimiento se puede llevar a cabo fuera de un entorno médico profesional.
- 25 En particular, el procedimiento en tiempo real proporciona un procedimiento rápido para la determinación de si un individuo está infectado o no con tuberculosis activa con un ensayo *de punto final*, es decir, como un ensayo en o cerca del sitio de atención al paciente. El ensayo de la presente invención proporciona ensayos médicos simples que se pueden llevar a cabo a pie de cama.

Además, el procedimiento en tiempo real solo necesita tomar una muestra del sujeto, cuya muestra se puede utilizar directamente en el procedimiento de la invención.

El procedimiento en tiempo real de la invención se explicará ahora con más detalle en referencia a las etapas del procedimiento en tiempo real.

Etapas i (procedimiento en tiempo real)

El procedimiento en tiempo real de la invención se basa en el ensayo diagnóstico de muestras, en particular muestras de sangre de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa. Para este fin, en la etapa i) del procedimiento en tiempo real de la invención, se proporciona una muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa. La muestra preferentemente es una muestra de sangre completa. La muestra se puede obtener por cualquier medio regular de obtención de sangre de un sujeto. Con el fin de utilizarse en el procedimiento de la invención, se pueden utilizar muestras que se han recolectado en un estadio anterior, almacenado hasta su uso en condiciones adecuadas y proporcionadas en un momento adecuado. De manera alternativa, se puede utilizar una muestra en el procedimiento de la invención en el sitio, es decir como un ensayo *de punto final*. En esta última situación, será particularmente adecuado el uso del dispositivo portátil de la invención.

En el caso de que la muestra sea una muestra de sangre completa, la muestra puede, dependiendo de la manera de detección de la unión de los anticuerpos al antígeno, filtrarse o separarse en plasma o suero antes de la etapa ii). En el caso de que la detección se lleve a cabo por medio de detección por diferencias de pesos, se puede preferir una etapa de filtrado para eliminar por filtración los componentes de peso alto tales como las células sanguíneas. En el caso de que se detecte la unión por fluorescencia, se puede escoger no filtrar la muestra. Esto acortaría incluso el tiempo necesario para el diagnóstico.

La muestra preferentemente es una muestra derivada de la sangre. La muestra puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de plasma o una muestra de suero. El suero sanguíneo es plasma sanguíneo sin los factores de coagulación y se prefiere al plasma. La palabra plasma en la presente solicitud, puede también, por lo tanto, referirse a suero (sanguíneo). La elección de plasma sanguíneo o suero sanguíneo depende de si el dispositivo de la invención se diseña para separar la sangre completa en plasma o suero. El suero se prefiere debido a que contienen

menos materiales diferentes que el plasma sanguíneo lo que puede dar lugar a interacciones no específicas o una actividad biológica no deseada. Además, el suero puede tener una viscosidad más baja que el plasma sanguíneo. Por lo tanto, utilizando suero se puede obviar la necesidad de dilución de la muestra lo que ahorra tiempo y materiales.

- 5 Aproximadamente un 55 % de la sangre completa consiste en plasma/suero. Si no se filtra perfectamente una muestra de sangre completa o si la situación física del paciente lo necesita, puede ser deseable diluir la muestra de sangre completa o plasma o suero. Las palabras plasma o suero en la presente solicitud pueden por lo tanto referirse también a plasma o suero diluidos.

10 Una dilución de la sangre o el plasma se puede implementar por lo tanto en un procedimiento en tiempo real de la invención, tal como una dilución de 250 a 5000 x, una dilución de 750 a 1250 x, tal como, por ejemplo, una dilución de 4000, 2000 o 1000 x. Dependiendo de la viscosidad de la muestra, dicha solución puede tener lugar antes de la etapa de separación del plasma de la sangre o después de la etapa de separación o de manera alternativa a la etapa de separación. Por ejemplo, la etapa de dilución puede tener lugar después de la etapa de separación, pero antes de la etapa iv) o v) o después de la etapa v)/vi) o antes de la etapa vii). Se prefiere diluir la muestra después de la etapa v)/vi) y antes de la etapa vii), es decir, justo antes de que las muestras entren en el biosensor. De esta manera el volumen de la muestra se mantiene lo más bajo posible durante la mayoría de las etapas de los procedimientos de la invención, lo que es beneficioso para la velocidad del procedimiento y la compactibilidad del dispositivo.

20 La dilución se puede llevar a cabo con cualquier diluyente adecuado, por ejemplo, un tampón basado en PBS. Dicho tampón puede ser, por ejemplo, un tampón PBS/AE que comprenda NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y EDTA en agua a un pH fisiológico. Dicho tampón puede ser un tampón basado en PBS que consista en 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , y 1,05 g Na_2HPO_4 por litro de agua doble destilada desionizada que contenga 1 mM de EDTA y un 0,025 % (p/v) de azida sódica que se ajusta a un pH de 7,4.

25 La muestra de sangre completa o plasma o suero se puede diluir adicionalmente con agentes que eviten la coagulación sanguínea, tales como EDTA, heparina o citrato.

Opcionalmente, se puede añadir un detergente a baja concentración a la sangre/plasma/suero para evitar que los componentes se peguen a las paredes del tubo, vaso o recipiente.

Etapas ii (procedimiento en tiempo real)

En la etapa ii, la muestra se expone a, es decir, se pone en contacto con un esteroles lipídico.

30 Aunque los inventores no desean ligarse a teoría alguna, se asume que el esteroles lipídico depura los anticuerpos anti-colesterol de la muestra que de otra manera reaccionarían de manera cruzada con los antígenos de ácido micólico en el sustrato sensor y darían lugar a un diagnóstico positivo falso de tuberculosis.

35 El tiempo de exposición de la muestra al esteroles lipídico preferentemente es menor de 10 minutos, tal como 2 a 8, 3 a 7, 4 a 6 o aproximadamente 5 minutos. El tiempo de exposición depende de la manera en que se ponga en contacto la muestra con el esteroles lipídico.

40 Una manera ejemplar de exponer la muestra al esteroles lipídico es dejar la muestra en un largo canal en espiral y pasarla a lo largo de la longitud del canal, que está pre-revestido con un esteroles lipídico, que preferentemente es colesterol. En el extremo del canal, la muestra expuesta al esteroles lipídico puede pasar por un medio para la división de la corriente de muestra tal como un punto ramificado con una válvula pasiva que conduzca las corrientes de muestra dividida hacia el siguiente sustrato que lleva un antígeno derivado del ácido micólico inmovilizado de la etapa v) y el sustrato que no lleva el antígeno derivado del ácido micólico de la etapa vi), es decir, un recipiente que comprenda un sustrato que lleve inmovilizado el antígeno derivado del ácido micólico, y un recipiente que comprenda un sustrato que no lleve inmovilizado el antígeno derivado del ácido micólico.

45 Una manera ejemplar alternativa de exposición de la muestra al esteroles lipídico es inyectarla en un recipiente revestido con colesterol seguido por la incubación en el mismo durante menos de 10 minutos.

La sangre completa/plasma/suero son ricos en cientos de tipos diferentes de moléculas con propiedades de hidrófilas a hidrófobas. Por lo tanto, se utilizará un material de sustrato que sea inerte para la unión no específica de moléculas de la muestra. En este contexto, se debería entender que el sustrato sea un material de soporte.

Etapas iv y v (procedimiento en tiempo real)

50 En la siguiente etapa una fracción de la muestra expuesta al esteroles lipídico se expone a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (etapa iv)) y otra fracción de la muestra expuesta al esteroles lipídico se expone a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (etapa v)).

Para obtener al menos dos fracciones, en un cierto momento del procedimiento, la corriente de sangre/plasma se tiene que dividir (etapa iii del procedimiento en tiempo real). Por conveniencia y para optimizar la fiabilidad del

procedimiento, se prefiere que la corriente se divida después de la exposición al esteroil lipídico, es decir, que la muestra expuesta al esteroil lipídico se divida en al menos dos fracciones para proporcionar una corriente de ensayo y una corriente de control. Se prefiere que la muestra se divida en dos fracciones iguales o sustancialmente iguales, debido a que esto favorece la comparación simple de ambas fracciones sin la necesidad de cálculos de corrección.

5 La división de la corriente de la muestra se puede llevar a cabo por cualquier medio para dividir la corriente de muestra tal como un punto ramificado con una válvula pasiva.

De manera alternativa, la corriente de muestra (que se filtra en plasma o suero) se divide en al menos dos fracciones después de la etapa de filtrado, pero antes de la exposición al esteroil lipídico. De manera alternativa, la corriente sanguínea se divide antes de la filtración. Esto es menos preferido debido a que en este caso son necesarios dos filtros.

10

El sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico y el sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico de las etapas iv) y v) son preferentemente del mismo material.

Además, como los esteroides lipídicos (por ejemplo, el colesterol) y los derivados del ácido micólico son ambos hidrófobos, los sustratos para la exposición de las etapas iv) y v) serán del mismo material que el sustrato que se puede utilizar en la etapa ii). Se entenderá que un material de sustrato adecuado es inerte para la unión no específica de moléculas de esta muestra.

15

El tiempo de exposición de la muestra al esteroil lipídico preferentemente es menor de 10 minutos, tal como 2 a 8, 3 a 7, 4 a 6 o aproximadamente 5 minutos.

Una manera ejemplar de exposición de la muestra a los sustratos de la etapa iv) y v) es dirigir las corrientes de muestra dividida en canales espirales, preferentemente implementados en microchips, pre-revestidos con un derivado del ácido micólico (etapa iv) o sin un derivado del ácido micólico (etapa v) y pasarla a lo largo de la longitud de estos canales. La distancia de ambos canales hasta el biosensor necesitará ser de la misma longitud. Es importante que haya la menor unión no específica que sea posible al material de sustrato.

20

Una manera ejemplar alternativa de exposición de las muestras divididas expuestas al esteroil lipídico a un sustrato revestido con un derivado del ácido micólico o sin un derivado del ácido micólico es inyectar la primera corriente en un recipiente que contenga un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (etapa iv), y una segunda corriente de muestra en un recipiente que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado el antígeno derivado del ácido micólico (etapa v) e incubar las muestras durante menos de 10 minutos, tal como 2 a 8, 3 a 7, 4 a 6 o aproximadamente 5 minutos.

25

30 **Etapas vi (procedimiento en tiempo real)**

En esta etapa las corrientes de muestra expuestas al esteroil lipídico, que se han expuesto a los derivados del ácido micólico en la etapa iv (corriente de ensayo) o no en la etapa v (corriente de control) se pasan por sustratos adicionales, los sustratos de ensayo y control respectivamente, que llevan derivados del ácido micólico, preferentemente los mismos derivados que en la etapa iv.

Estos sustratos de ensayo y control están contenidos en un biosensor que comprende una primera cámara (cámara de ensayo) con un sustrato de ensayo para la recepción de la corriente de ensayo expuesta a los derivados del ácido micólico de la etapa iv), y una segunda cámara (cámara de control) con un sustrato de control para la recepción de la corriente de control no expuesta a derivados del ácido micólico de la etapa v). Los sustratos de ambas cámaras son preferentemente del mismo material y llevan el mismo derivado del ácido micólico. Un biosensor en este contexto puede ser cualquier medio capaz de generar una señal medible cuando los anticuerpos entran en contacto con los derivados del ácido micólico de los sustratos de ensayo y de control.

35

40

Preferentemente, los sustratos de ensayo y de control de la etapa vi) están basados en silicio, tal como los sustratos basados en dióxido de silicio. Los sustratos basados en silicio son particularmente útiles cuando se utiliza una tecnología de resonancia de anillo para detectar la unión de anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico. Preferentemente, la detección se lleva a cabo utilizando un chip biosensor utilizando un resonador de anillo basado en Si. Esto hace posible que se lleve a cabo el procedimiento de la invención con un dispositivo muy compacto.

45

También es posible que los sustratos de la etapa vi) estén basados en oro. Los sustratos basados en oro son particularmente útiles cuando se utiliza una resonancia de plasmones superficiales o espectroscopia de impedancia electroquímica para detectar la unión de anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico.

50

Etapas vii y viii (procedimiento en tiempo real)

En la etapa vii se detecta la unión de los anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico. Debido a que la detección tiene lugar en tiempo real, la unión de los anticuerpos a los sustratos de la etapa vi se detectan directamente durante el proceso de unión. Por lo tanto, se tiene que entender que las etapas vi y vii no son etapas que necesiten tener lugar en momentos distintos. Esto se aplica también para la etapa viii, es decir, la comparación

55

de la unión entre los sustratos de ensayo y de control y la detección puede tener lugar mientras el proceso de unión de la etapa vii está aún en curso. Para la detección en principio se pueden utilizar todas las técnicas de análisis de marcador libre en tiempo real, tales como resonancia de plasmones superficiales o titulación por calorimetría isotérmica de espectroscopia de impedancia electroquímica, interferometría de biocapa, rejillas ópticas, cristal fotónico, perfil de resonancia acústica, microequilibrios de cristal de cuarzo.

La detección de la unión de los anticuerpos y/u otro material al antígeno del ácido micólico se puede llevar a cabo en un dispositivo automático. Distintos dispositivos automáticos serán conocidos para el experto en la técnica y el experto será capaz de seleccionar los medios de software adecuado para hacer la comparación de la etapa viii) del grado o extensión de unión entre los sustratos de ensayo y de control, en el que cualquier unión menor que se observe en el sustrato de ensayo es un indicador de la presencia de anticuerpos contra el antígeno en las muestras que se relacionan con tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se originan las muestras. En este contexto, se debería entender que menor se puede interpretar cualitativa o cuantitativamente, es decir, una unión menor puede interpretarse como que tiene menos eventos de unión, así como que tiene uniones más débiles.

Dispositivo para llevar a cabo el procedimiento en tiempo real

En otro aspecto, la invención se refiere a un dispositivo portátil para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa, que comprende al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico dispuesto y configurado para la recepción de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa; medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; estando dicho medio conectado corriente arriba o corriente abajo de dicho al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico; un recipiente adicional para la recepción de dicha primera corriente de muestra en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico, y comprendiendo un primer sustrato que llevan inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un recipiente más adicional y en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico; y que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y un biosensor que comprende una primera cámara para la recepción de la primera corriente de muestra en conexión con dicho recipiente adicional, que comprende un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico y una segunda cámara para la recepción de una segunda muestra en conexión con dicho recipiente más adicional que comprende el mismo sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico que la primera cámara.

Preferentemente, el dispositivo de la invención comprende un extremo que penetra la piel conectado con un primer tubo, que está dispuesto y configurado para la recepción de una muestra de sangre desde el extremo que penetra la piel y lleva dicha sangre desde el sitio de la piel a dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico.

En otra realización preferida el dispositivo comprende una unidad de filtro en conexión con dicho primer tubo para la recepción de la muestra de sangre y se configura para separar el plasma de dicha muestra de sangre completa.

En una realización preferida adicional, el dispositivo portátil comprende un extremo que penetra la piel conectado a un primer tubo que está dispuesto y configurado para la recepción de una muestra de sangre desde el extremo que penetra la piel; una unidad de filtro en conexión con dicho primer tubo para la recepción de dicha muestra de sangre y configurado para separar el plasma de dicha muestra de sangre completa; un primer recipiente para la recepción de dicha muestra, comprendiendo dicho primer recipiente un esteroil lipídico; medios para la división de dicha muestra en al menos una segunda y una tercera corriente de muestra; un segundo recipiente para la recepción de dicha primera corriente de muestra, comprendiendo dicho recipiente un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un tercer recipiente para la recepción de dicha segunda corriente de muestra, comprendiendo dicho recipiente un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; y un biosensor que comprende una primera cámara para la recepción de la primera corriente de muestra en conexión con el segundo recipiente, que comprende un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico y una segunda cámara para la recepción de la segunda corriente de muestra en conexión con el tercer recipiente que comprende el mismo sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico que la primera cámara.

La corriente a través del aparato se dirige preferentemente mediante una bomba, preferentemente una bomba de flujo continuo, por ejemplo, una bomba peristáltica o una bomba de diafragma. La bomba se localiza preferentemente corriente abajo del biosensor, con el fin de que sea capaz de aspirarla muestra a través del aparato y para evitar la contaminación de la muestra antes del análisis.

Los medios de penetración de la piel puede ser cualquier medio adecuado para obtener una muestra de sangre de un ser humano o animal, tal como una aguja de jeringa o similar.

El primer tubo tiene unas dimensiones que son adecuadas para el fin del dispositivo, es decir, necesita que sea bien adaptable al medio de penetración de la piel y el primer recipiente.

Los componentes del dispositivo, es decir, los recipientes, medios de dilución, unidad de filtro y biosensor pueden estar interconectados por tubos de intercomunicación adecuados. De manera alternativa, los componentes del dispositivo se pueden diseñar de manera que se puedan conectar directamente entre ellos. El material de los tubos

que se utilizan en la invención puede ser de cualquier material adecuado que sea conocido por el experto en el campo del ensayo de muestras de sangre. Los materiales adecuados son inertes para los componentes de la sangre/plasma/suero e incluyen politetrafluoroetileno (por ejemplo, Teflon®), polipropileno, poliéter cetona (PEEK) y polietileno.

- 5 Los componentes adicionales pueden conectarse entre los componentes del dispositivo. Dichos componentes adicionales pueden conectarse por tubos que interconectan los componentes directamente unidos a los componentes.

10 El dispositivo de la invención también puede comprender un medio para la dilución de la sangre o el plasma. Dichos medios se pueden implementar antes del recipiente que contiene el esteroil lipídico, antes de la unidad de filtro, entre la unidad de filtro y el recipiente que contiene el esteroil lipídico, entre el recipiente que contiene el esteroil y los otros recipientes (adicional y más adicional o segundo y tercero) o entre el adicional/más adicional o segundo/tercer recipiente y las cámaras respectivas del biosensor. Preferentemente los medios de dilución de la muestra se conectan entre el recipiente adicional o segundo y el biosensor y entre el el recipiente más adicional o tercero y el biosensor. Por ejemplo, se puede implementar un recipiente de 10 ml en la salida del adicional o segundo y más adicional o tercer recipientes. Puede haber ya un tampón adecuado en el recipiente o se puede añadir a este recipiente para proporcionar la dilución deseada. De esta manera el volumen de la muestra se mantiene lo más bajo posible durante la mayoría de las etapas de los procedimientos de la invención, lo que es beneficioso para la velocidad del procedimiento y la compactibilidad del dispositivo.

20 Los recipientes pueden ser vasos o un canal o tubos, tal como un canal en espiral o un tubo en espiral. Se prefiere un canal o tubo en espiral debido a que dicha estructura ocupa poco espacio mientras se mantiene un largo tramo de flujo. Un canal o tubo en espiral se puede implementar ventajosamente en un microchip. Esto contribuye a la compactibilidad del dispositivo de la invención.

La unidad de filtro puede comprender una matriz de filtro. Preferentemente, el filtro se implementa sobre un microchip de filtro para la compactibilidad.

- 25 El material de los recipientes es preferentemente el mismo y los materiales adecuados pueden ser cristal bk-7, politetrafluoroetileno, polipropileno, poliéter cetona o polietileno.

Los sustratos de los recipientes tienen que ser de un material que sea inerte para la unión no específica de las moléculas de la muestra, por ejemplo, cristal bk-7, politetrafluoroetileno, polipropileno, poliéter cetona o polietileno.

30 El dispositivo comprende un recipiente que comprende un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (segundo recipiente) y un recipiente que comprende un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico. En vez de un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico, el último recipiente puede tener un revestimiento inerte o ningún revestimiento, a condición de que no tenga lugar una unión no específica.

35 Preferentemente, los sustratos de ensayo y de control de las cámaras del biosensor están basados en silicio, tal como los sustratos basados en dióxido de silicio. Los sustratos basados en silicio son particularmente útiles cuando se utiliza una tecnología de resonancia de anillo para detectar la unión de anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico.

40 El biosensor comprende una primera y una segunda cámara. Se tiene que entender que no es necesario que las dos cámaras estén en un compartimento o carcasa. Por ejemplo, el biosensor puede comprender dos unidades de sensor separadas que comprenda cada una una cámara con un sustrato que tiene antígenos derivados del ácido micólico, estando una unidad de sensor en conexión mediante un tubo con un recipiente que comprende un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, estando la otra unidad de sensor en conexión mediante un tubo con un recipiente que comprende un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico.

45 Preferentemente, el biosensor comprende un resonador de anillo basado en Si. Esto hace posible que el dispositivo de la invención sea muy compacto.

A este respecto, la invención también se refiere a un biosensor, que comprende al menos dos cámaras que comprenden un sustrato basado en silicio con un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico y un resonador de anillo de Si.

50 También es posible que los sustratos de las cámaras del biosensor estén basados en oro. Los sustratos basados en oro son particularmente útiles cuando se utiliza una resonancia de plasmones superficiales o espectroscopia de impedancia electroquímica para detectar la unión de anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico.

55 El dispositivo de la invención se puede conectar con cualquier medio de análisis automático, tal como una computadora con programas de software para llevar a cabo la comparación de la unión de los anticuerpos del ácido micólico respecto a los antígenos inmovilizados en las cámaras del biosensor.

Una realización ejemplar del dispositivo de la invención se muestra en la Fig. 1.

La Fig. 1 muestra una aguja 1 de penetración en la piel conectada a un primer tubo 2, que está dispuesto y configurado para la recepción de la sangre desde la aguja 1 y que lleva la cantidad de sangre lejos del sitio de la piel. El tubo 1 está conectado a una unidad de filtro 3. Esta unidad de filtro sirve para separar el plasma de dicha muestra de sangre completa. La unidad de filtro 3 se conecta mediante un tubo 13 a un primer recipiente 4 que tiene la forma de un canal en espiral cuya pared interior está revestida con un esteroil lipídico. El canal en espiral se conecta mediante el tubo 14 con un medio para la división del plasma 5 en forma de un punto de ramificación con una válvula pasiva. Una rama del punto de ramificación se conecta mediante un tubo 16 con un segundo recipiente 6 para la recepción de una primera corriente de plasma, que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico. La otra rama del punto de ramificación se conecta mediante un tubo 15 con un tercer recipiente 7 para la recepción de una segunda corriente de plasma, que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico. Los recipientes 6 y 7 en esta realización tienen forma de un canal en espiral cuya pared interior está revestida con un antígeno derivado del ácido micólico (recipiente 6) o no revestido con un antígeno derivado del ácido micólico (recipiente 7). Los recipientes 6 y 7 están conectados mediante el tubo 17 y 18 respectivamente con los recipientes de dilución 11 y 12, respectivamente. Estos recipientes pueden precargarse con un tampón de dilución adecuado o comprenden las entradas 21, 22 para la introducción del tampón de dilución. Los recipientes de dilución 21 y 22 están conectados mediante los tubos 19 y 20 respectivos a una cámara de ensayo 9 de un biosensor 8 y a una cámara de control 10 del biosensor 8, respectivamente. Las cámaras de ensayo y de control 9 y 10 comprenden ambas el mismo sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico.

Kit

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para su uso en el diagnóstico de la tuberculosis utilizando un procedimiento de detección en tiempo real, que comprende uno o más medios de penetración de la piel; uno o más tubos; uno o más recipientes revestidos con un esteroil lipídico y opcionalmente fosfatidil colina, pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina; uno o más recipientes que comprenden un sustrato con un antígeno derivado del ácido micólico; uno o más recipientes que comprenden un sustrato sin un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico; y uno o más biosensores que comprenden al menos dos cámaras que comprenden un sustrato con un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico; y opcionalmente medios para la dilución de la sangre o el plasma y/o una unidad de filtro.

El kit puede también comprender herramientas para ensamblar los componentes tales como tornillos, pinzas, pegamento, cinta, destornilladores, etc.

El kit también puede comprender medios para la dilución de la sangre o el plasma durante el análisis de sangre. Dicho recipiente (por ejemplo, de 10 ml) se puede implementar a la salida del segundo y tercer recipiente. Puede haber ya un tampón adecuado en el recipiente o se puede añadir a este recipiente para proporcionar la dilución deseada.

Los componentes del kit hacen posible que la persona que va a llevar a cabo el ensayo de diagnóstico de tuberculosis monte el dispositivo de la invención *de punto final*, es decir en el punto de atención. Por lo tanto, se va a entender que los componentes del kit tienen las mismas características y propiedades preferidas que se han explicado anteriormente para el dispositivo de la invención. El dispositivo de la invención es fácil de montar mediante los componentes del kit de la invención, es decir, no se necesita un respaldo técnico especialista. El kit puede estar provisto convenientemente con instrucciones de montaje y uso.

Procedimiento de punto final

La presente invención se refiere en un aspecto adicional a un procedimiento para la detección de anticuerpos contra derivados del ácido micólico, tal como anticuerpos de factores cordales o anticuerpos del ácido micólico (MA) en una muestra, en el que la detección tiene lugar mediante un ensayo *de punto final*.

Este procedimiento comprende las etapas de:

- i) proporcionar una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa;
- ii) poner en contacto dicha muestra con un esteroil lipídico;
- iii) obtener al menos dos fracciones de dicha muestra sea antes o después de su exposición a dicho esteroil lipídico;
- iv) exponer la primera de dichas fracciones a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
- v) exponer la segunda de dichas fracciones a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
- vi) exponer al menos parte de la fracción de muestra expuesta en la etapa iv) a un sustrato de ensayo que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico y exponer al menos parte de la fracción de muestra expuesta en la etapa v) a un sustrato de control que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;
- vii) detectar la unión de anticuerpos al antígeno de la etapa vi) en un ensayo *de punto final*; y

viii) comparar el grado o extensión de unión del anticuerpo entre los sustratos de ensayo y de control, siendo cualquier unión menor observada al sustrato de ensayo un indicador de la presencia de anticuerpos al antígeno en la muestra que indica tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se origina la muestra. Se hará referencia a este procedimiento a lo largo de la solicitud como el "procedimiento *de punto final*".

5 Las etapas de pretratamiento i)-v) no tienen necesariamente que continuar con las etapas de detección vi)-viii). Por ejemplo, las fracciones de muestra obtenidas después de la etapa v) se pueden almacenar hasta su uso posterior o para el transporte al sustrato de detección. De esta manera la práctica tiene gran flexibilidad en la planificación de su ensayo. Por ejemplo, el hecho de las etapas i)-iv) no tienen necesariamente que continuar con las etapas vi)-viii) permite que las muestras pretratadas se recolecten de manera que se puedan ensayar todas a la vez en un material de sustrato, lo que mejora la fiabilidad y reproducibilidad. Esto también hace más fácil ensayar las muestras de múltiples pacientes en las mismas condiciones.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento para el pretratamiento de una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener una tuberculosis activa para la detección:

- 15 i) proporcionando una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa;
- ii) exponiendo dicha muestra a un esterol lipídico;
- iii) obteniendo al menos dos fracciones de dicha muestra sea antes o después de su exposición a dicho esterol lipídico;
- iv) exponiendo la primera de dichas fracciones a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
- 20 v) exponiendo la segunda de dichas fracciones a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;

en el que tras la exposición en las etapas iv) y v) al menos parte de las fracciones de la muestra se almacenan para su uso posterior. Se hará referencia a este procedimiento a lo largo de la solicitud como el "procedimiento de pretratamiento".

25 También, el procedimiento *de punto final* de la invención hace posible que las muestras, preferentemente las muestras de sangre se analicen de una manera fiable y rápida. Las etapas de preincubación posteriores i)-v) de la muestra con un esterol lipídico, seguidas por el sometimiento de una fracción de la muestra a una etapa de preincubación con un antígeno derivado del ácido micólico para obtener una muestra de ensayo y otra fracción de la muestra a una preincubación sin el antígeno derivado del ácido micólico para obtener una muestra de control que da lugar a la muestra adecuada para la aplicación directa en la etapa de detección *de punto final* eventual que implica la unión de los antígenos de ácido micólico en la muestra pretratada a un sustrato que tiene el ácido micólico. El sustrato no necesita por lo tanto una preincubación o pretratamiento del sensor con una dilución de la muestra. En consecuencia, las varias etapas de dilución y transferencia necesarias en los procedimientos de la técnica anterior no son necesarios.

35 Adicionalmente, el procedimiento *de punto final* hace posible determinar si un individuo está infectado o no con tuberculosis activa (por ejemplo, tuberculosis pulmonar o extrapulmonar) de una manera rápida y fiable, permitiendo la detección de tuberculosis en menos de 15 a 25 minutos. Esto se debe en particular a las etapas de pretratamiento i)-v) del procedimiento *de punto final* y el procedimiento de pretratamiento. Además, el procedimiento *de punto final* se puede llevar a cabo fuera de un entorno médico profesional. En particular, se proporciona con el presente documento un procedimiento rápido para la determinación de si un individuo está infectado o no con tuberculosis activa con un ensayo en el punto de atención, es decir, como un ensayo en o cerca del sitio de atención al paciente. El ensayo de la presente invención proporciona ensayos médicos simples que se pueden llevar a cabo a pie de cama.

45 Además, debido a las etapas de pretratamiento i)-v) la toma de una muestra del sujeto es suficiente, cuya muestra se puede utilizar directamente para la detección sin un tratamiento adicional.

El principio de este aspecto de la invención se explicará ahora con más detalle en referencia a las etapas del procedimiento *de punto final* y el procedimiento de pretratamiento.

Etapas i) (procedimiento *de punto final*/procedimiento de pretratamiento)

50 El procedimiento *de punto final* de la invención se basa en el ensayo diagnóstico de muestras, en particular muestras de sangre de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa. Para este fin, en la etapa i) se proporciona una muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa. La muestra preferentemente es una muestra de sangre completa. La muestra se puede obtener por cualquier medio regular de obtención de sangre de un sujeto. Con el fin de utilizarse en los procedimientos de la invención, se pueden utilizar muestras que se han recolectado en un estadio anterior, almacenado hasta su uso en condiciones adecuadas y proporcionadas en un momento adecuado. De manera alternativa, se puede utilizar una muestra en el procedimiento de la invención en el sitio, es decir como un ensayo *de punto final*. Otra alternativa es que la muestra se pretrata en el sitio de acuerdo con las etapas i)-v) mencionadas anteriormente, y las muestras pretratadas resultantes se almacenan hasta un uso posterior y/o sean transferidas a otra localización donde tenga lugar la detección.

En el caso de que la muestra sea una muestra de sangre completa, la muestra puede, dependiendo de la manera de detección de la unión de los anticuerpos al antígeno, filtrarse o separarse en plasma o suero antes de la etapa ii). En el caso de que la detección se lleve a cabo por medio de detección por diferencias de pesos, se puede preferir una etapa de filtrado para eliminar por filtración los componentes de peso alto tales como las células sanguíneas. En el caso de que se detecte la unión por fluorescencia, se puede escoger no filtrar la muestra. Esto acortaría incluso el tiempo necesario para el pretratamiento y el diagnóstico.

La muestra preferentemente es una muestra derivada de la sangre. La muestra puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de plasma o una muestra de suero. El suero sanguíneo es plasma sanguíneo sin los factores de coagulación y se prefiere al plasma. La palabra "plasma" en la presente solicitud, puede también, por lo tanto, referirse a suero (sanguíneo). La elección de plasma sanguíneo o suero sanguíneo depende de si el dispositivo de la invención se diseña para separar la sangre completa en plasma o suero. El suero se prefiere debido a que contienen menos materiales diferentes que el plasma sanguíneo lo que puede dar lugar a interacciones no específicas o una actividad biológica no deseada. Además, el suero puede tener una viscosidad más baja que el plasma. Por lo tanto, utilizando suero se puede obviar la necesidad de dilución de la muestra lo que ahorra tiempo y materiales.

Aproximadamente un 55 % de la sangre completa consiste en plasma/suero. Si no se filtra perfectamente una muestra de sangre completa o si la situación física del paciente lo necesita, puede ser deseable diluir la muestra de sangre completa o plasma o suero. Las palabras plasma o suero en la presente solicitud pueden por lo tanto referirse también a plasma o suero diluidos.

Se puede implementar una dilución de la sangre o plasma en los procedimientos de la invención. Se prefiere una dilución de 10 x a 250 x, en particular cuando el ensayo *de punto final* que se aplica es un ensayo de filtración con inmunotinción con oro, tal como un ensayo de filtración con inmunotinción puntual con oro. Dependiendo de la viscosidad de la muestra, dicha solución puede tener lugar antes de la etapa de separación del plasma de la sangre o después de la etapa de separación o de manera alternativa a la etapa de separación. Por ejemplo, la etapa de dilución puede tener lugar después de la etapa de separación, pero antes de la etapa iv) o v) o después de la etapa v) o antes de la etapa vii).

La dilución se puede llevar a cabo con cualquier diluyente adecuado, por ejemplo, un tampón basado en PBS. Dicho tampón puede ser, por ejemplo, un tampón PBS/AE que comprenda NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y EDTA en agua a un pH fisiológico. Dicho tampón puede ser un tampón basado en PBS que consista en 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , y 1,05 g Na_2HPO_4 por litro de agua doble destilada desionizada que contenga 1 mM de EDTA y un 0,025 % (p/v) de azida sódica que se ajusta a un pH de 7,4.

La muestra de sangre completa o plasma o suero se puede diluir adicionalmente con agentes que eviten la coagulación sanguínea, tales como EDTA, heparina o citrato.

Opcionalmente, se puede añadir un detergente a baja concentración a la sangre/plasma/suero para evitar que los componentes se peguen a las paredes del tubo, vaso o recipiente.

Etapa ii (procedimiento de punto final/procedimiento de pretratamiento)

En la etapa ii, la muestra se expone a, es decir, se pone en contacto con un esteroil lipídico.

Aunque los inventores no desean ligarse a teoría alguna, se asume que el esteroil lipídico depura los anticuerpos anti-colesterol de la muestra que de otra manera reaccionarían de manera cruzada con los antígenos de ácido micólico en el sustrato y darían lugar a un diagnóstico positivo falso de tuberculosis.

El tiempo de exposición de la muestra al esteroil lipídico preferentemente es menor de 10 minutos, tal como 2 a 8, 3 a 7, 4 a 6 o aproximadamente 5 minutos. El tiempo de exposición depende de la manera en que se ponga en contacto la muestra con el esteroil lipídico.

Una manera ejemplar de exponer la muestra al esteroil lipídico es dejar la muestra en un largo canal en espiral y pasarla a lo largo de la longitud del canal, que está pre-revestido con un esteroil lipídico, que preferentemente es colesterol. En el extremo del canal, la muestra expuesta al esteroil lipídico puede pasar por un medio para la división de la corriente de muestra tal como un punto ramificado con una válvula pasiva que conduzca las corrientes de muestra dividida hacia el siguiente sustrato que tiene un antígeno derivado del ácido micólico inmovilizado de la etapa v) y el sustrato que no tiene el antígeno derivado del ácido micólico de la etapa vi), es decir, un recipiente que comprenda un sustrato que lleve inmovilizado el antígeno derivado del ácido micólico, y un recipiente que comprenda un sustrato que no lleve inmovilizado el antígeno derivado del ácido micólico.

Una manera ejemplar alternativa de exposición de la muestra al esteroil lipídico es inyectarla en un recipiente revestido con colesterol seguido por la incubación en el mismo durante menos de 10 minutos.

Otra manera alternativa ejemplar es exponer la muestra al esteroil lipídico, en la que el esteroil lipídico está contenido en un compartimento de una columna. En dicho compartimento, el esteroil lipídico está preferentemente revistiendo unas perlas.

La sangre completa/plasma/suero son ricos en cientos de tipos diferentes de moléculas con propiedades de hidrófilas a hidrófobas. Por lo tanto, se utilizará un material de sustrato que sea inerte para la unión no específica de moléculas de la muestra. En este contexto, se debería entender que el sustrato sea un material de soporte.

Etapas iv y v (procedimiento de punto final/procedimiento de pretratamiento)

- 5 En la siguiente etapa una fracción de la muestra expuesta al esteroil lipídico se expone a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (etapa iv)) y otra fracción de la muestra expuesta al esteroil lipídico se expone a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (etapa v)).

10 Para obtener al menos dos fracciones, en un cierto momento del procedimiento, la corriente de sangre/plasma se tiene que dividir (etapa iii). Por conveniencia y para optimizar la fiabilidad del procedimiento, se prefiere que la corriente se divida después de la exposición al esteroil lipídico, es decir, que la muestra expuesta al esteroil lipídico se divida al menos en dos fracciones para proporcionar una corriente de ensayo y una corriente de control. Se prefiere que la muestra se divida en dos fracciones iguales o sustancialmente iguales, debido a que esto favorece la comparación simple de ambas fracciones sin la necesidad de cálculos de corrección. La división de la corriente de la muestra se puede llevar a cabo por cualquier medio para dividir la corriente de muestra tal como un punto ramificado con una válvula pasiva.

15 De manera alternativa, la corriente de muestra (que se filtra en plasma o suero) se divide en al menos dos fracciones después de la etapa de filtrado, pero antes de la exposición al esteroil lipídico. De manera alternativa, la corriente sanguínea se divide antes de la filtración. Esto es menos preferido debido a que en este caso son necesarios dos filtros.

- 20 En el caso de que se utilicen columnas la corriente se divide en este caso antes de la exposición al esteroil lipídico en la etapa ii), de manera que las etapas ii) y iv) pueden tener lugar en la misma columna y la etapa ii) y v) pueden tener lugar en otra columna.

El sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico y el sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico de las etapas iv) y v) son preferentemente del mismo material.

- 25 Además, como los esteroides lipídicos (por ejemplo, el colesterol) y los derivados del ácido micólico son ambos hidrófobos, los sustratos para la exposición de las etapas iv) y v) pueden ser del mismo material que el sustrato que se puede utilizar en la etapa ii). Se entenderá que un material de sustrato adecuado es inerte para la unión no específica de moléculas de esta muestra.

- 30 El tiempo de exposición de la muestra al esteroil lipídico preferentemente es menor de 10 minutos, tal como 2 a 8, 3 a 7, 4 a 6 o aproximadamente 5 minutos.

Una manera ejemplar de exposición de la muestra a los sustratos de la etapa iv) y v) es dirigir las corrientes de muestra dividida en canales espirales, preferentemente implementados en microchips, pre-revestidos con un derivado del ácido micólico (etapa iv) o sin un derivado del ácido micólico (etapa v) y pasarla a lo largo de la longitud de estos canales.

- 35 Una manera ejemplar alternativa de exposición de las muestras divididas expuestas al esteroil lipídico a un sustrato revestido con un derivado del ácido micólico o sin un derivado del ácido micólico es inyectar la primera corriente en un recipiente que contenga un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (etapa iv), y una segunda corriente de muestra en un recipiente que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado el antígeno derivado del ácido micólico (etapa v) e incubar las muestras durante menos de 10 minutos, tal como 2 a 8, 3 a 7, 4 a 6 o aproximadamente 5 minutos.

Otra manera alternativa es que las etapas iv) y v) tengan lugar en una columna. La corriente en este caso se divide antes de la exposición al esteroil lipídico en la etapa ii), de manera que las etapas ii) y iv) pueden tener lugar en una columna y la etapa ii) y v) pueden tener lugar en otra columna.

- 45 Aunque por razones de reproductibilidad y fiabilidad del procedimiento de detección se prefiere que en la etapa v) dicha otra fracción de la muestra expuesta al esteroil lipídico se exponga a un sustrato que no lleve inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, también es posible saltarse la etapa de exposición de dicha fracción a un sustrato que no lleve inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico y se almacene dicha fracción hasta su uso posterior, tal como en la etapa vi). Esto puede tener lugar, por ejemplo, en la misma columna o recipiente en el que tuvo lugar la incubación con el esteroil lipídico.

- 50 Por lo tanto, la invención también se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de:

- i) proporcionar una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa;
- ii) poner en contacto dicha muestra con un esteroil lipídico;
- iii) obtener al menos dos fracciones de dicha muestra sea antes o después de su exposición a dicho esteroil lipídico;

- iv) exponer la primera de dichas fracciones a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
- v) almacenar al menos parte de la segunda de dichas fracciones hasta la etapa vi);
- 5 vi) exponer al menos parte de la fracción de muestra expuesta en la etapa iv) a un sustrato de ensayo que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico y exponer al menos parte de la fracción de muestra almacenada en la etapa v) a un sustrato de control que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;
- vii) detectar la unión de anticuerpos al antígeno de la etapa vi) en un ensayo *de punto final*; y
- 10 viii) comparar el grado o extensión de unión del anticuerpo entre los sustratos de ensayo y de control, siendo cualquier unión menor observada al sustrato de ensayo un indicador de la presencia de anticuerpos al antígeno en la muestra que indica tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se origina la muestra.

En línea con lo dicho, la invención también se refiere a un procedimiento para el pretratamiento de una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener una tuberculosis activa para la detección:

- i) proporcionando una muestra de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa;
- 15 ii) exponiendo dicha muestra a un esterol lipídico;
- iii) obteniendo al menos dos fracciones de dicha muestra sea antes o después de su exposición a dicho esterol lipídico;
- iv) exponiendo la primera de dichas fracciones a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
- 20 v) almacenando al menos parte de la segunda de dichas fracciones para su uso posterior;

en el que tras la exposición en la etapa iv) al menos parte de la primera fracción de la muestra se almacena para su uso posterior.

Etapa vi (procedimiento *de punto final*)

25 En esta etapa las corrientes de muestra expuestas al esterol lipídico, que se han expuesto a los derivados del ácido micólico en la etapa iv (corriente de ensayo) o no en la etapa v (corriente de control) se pasan por sustratos adicionales, los sustratos de ensayo y control respectivamente, que llevan derivados del ácido micólico, preferentemente los mismos derivados que en la etapa iv.

30 Los sustratos de ensayo y de control pueden ser cualquier sustrato que pueda llevar inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico y en el que se pueda detectar la unión de entre los anticuerpos contenidos en la muestra a dichos antígenos.

En una realización preferida la detección tiene lugar mediante un ensayo de filtración con inmunotinción con oro. En dicho ensayo el sustrato de ensayo y de control son una membrana microporosa, preferentemente una membrana de nitrocelulosa, que está revestida de un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico.

35 El sustrato de ensayo y el sustrato de control pueden ser entidades separadas. De manera alternativa, el sustrato de ensayo y el sustrato de control pueden realizarse en posiciones diferentes sobre una entidad de sustrato. Por ejemplo, en el caso de una membrana microporosa, en sustrato de ensayo y el sustrato de control pueden estar formados por una primera membrana microporosa (por ejemplo, de nitrocelulosa) y una segunda membrana microporosa (por ejemplo, de nitrocelulosa). De manera alternativa, el sustrato de ensayo y el sustrato de control están contenidos en una membrana. En dicho caso, hay un área de ensayo donde tiene lugar la interacción anticuerpo/antígeno (por ejemplo, un punto) en una posición de la membrana y un área de control en la que tienen lugar la interacción anticuerpo/antígeno en otra posición de la membrana.

40

Etapas vii y viii (procedimiento *de punto final*)

45 En la etapa vii) se detecta la unión de los anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico en un ensayo *de punto final*. Al menos parte de las fracciones pretratadas obtenidas se sometió a dicho ensayo de detección *de punto final*. Es posible utilizar las fracciones completas para el ensayo *de punto final*. De manera alternativa, parte de las fracciones se utilizan para detectar la unión de los anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico en el ensayo *de punto final* y otra parte se almacena para su ensayo posterior dependiendo del resultado de la primera parte de las fracciones.

50 La expresión "ensayo *de punto final*" se tiene que entender como un ensayo en el que el resultado de interés es el resultado final después de un periodo de incubación del ensayo fijo, a diferencia del llamado ensayo en tiempo real. En el contexto del procedimiento de detección de la invención lo que significa es que las muestras tratadas obtenidas después de las etapas iv) y v) se toman y someten a un ensayo que proporciona una indicación de la cantidad de anticuerpos que están presentes en las muestras tratadas después de las etapas iv) y v).

55 Un ensayo de detección *de punto final* pueden detectar cambios, por ejemplo, en niveles de color, fluorescencia, absorbancia o luminiscencia al final del ensayo. En los ensayos *de punto final* la detección se puede llevar a cabo mediante técnicas tales como técnicas de detección por fotospectroscopia, microscopía de fluorescencia,

quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia. Esto puede implicar el uso, por ejemplo, de lectores de placa espectrofotométricos/colorimétricos, lectores de placas de fluorescencia o lectores de quimioluminiscencia.

5 Los ensayos *de punto final* adecuados pueden implicar un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), transferencia de Western, ensayo de marcado radioactivo, ensayo fotospectrométrico, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), etc. El ELISA, por ejemplo, implica al menos un anticuerpo con especificidad por un antígeno particular. En el contexto de la invención, el antígeno es un antígeno derivado del ácido micólico y el anticuerpo es un anticuerpo contra antígenos derivados del ácido micólico.

10 En un ensayo *de punto final* la interacción de los anticuerpos con los antígenos derivados del ácido micólico se puede llevar a cabo utilizando anticuerpos secundarios que se unen a la cadena pesada de los anticuerpos contra los derivados del ácido micólico. Hay muchos anticuerpos secundarios adecuados disponibles en el mercado. El anticuerpo secundario puede acoplarse a perlas, por ejemplo, perlas de oro, o asociarse con liposomas. Ejemplos de anticuerpos secundarios pueden ser Proteína A o G, posiblemente conjugados con una enzima que haga posible su detección.

15 Una técnica adecuada particular de detección de la unión de anticuerpos a los antígenos inmovilizados de ácido micólico de la etapa vii) es la denominada ensayo de filtración con inmunotinción con oro (IGFA), y en particular el ensayo de filtración con inmunotinción puntual con oro (DIGFA).

20 Los ensayos de filtración con inmunotinción con oro son procedimientos que combinan un ELISA y la técnica de inmunotinción con oro y son procedimientos en los que una muestra que se va a ensayar se deja filtrar a través de una membrana microporosa, preferentemente una membrana de nitrocelulosa, y se captura por una sonda de captura revestida sobre la membrana. Se deja que una sonda marcada con oro coloidal se filtre a través de la membrana microporosa de la misma manera. Utilizando una membrana microporosa como vehículo para la sonda de captura y empleando la acción de capilaridad y permeabilidad de los antígenos y anticuerpos de la membrana puedan reaccionar fácilmente y puedan someterse convenientemente a etapas opcionales de lavado y/o bloqueo.

25 Cuando la sonda marcada con oro coloidal se une a la sonda de captura las partículas de oro coloidal se agregan y aparece un punto rojo que es visible a simple vista.

Los ensayos de filtración con inmunotinción con oro son procedimientos de detección rápida y simple debido a que no se necesitan instrumentos excepto una membrana y los reactivos y los resultados se pueden observar a simple vista en pocos minutos.

30 En un ensayo de filtración con inmunotinción con oro la membrana microporosa puede ser, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de acetato de celulosa o una membrana de PVDF con un diámetro de poro adecuado. Preferentemente, se utiliza la nitrocelulosa. Un diámetro de poro adecuado es de 0,2 a 5 μm .

35 En el procedimiento *de punto final* los anticuerpos contenidos en la muestra se detectan por medio de un ensayo *de punto final*. En el caso del ensayo *de punto final* es un ensayo de filtración con inmunotinción con oro, el sustrato mencionado en las etapas vi) y viii) del procedimiento de detección de la invención, es una membrana microporosa, preferentemente una membrana de nitrocelulosa, que está revestida con un antígeno inmovilizado derivado de ácido micólico. Tras la inmovilización del antígeno derivado de ácido micólico en la membrana microporosa, las fracciones de muestra pretratadas en las etapas i) a v) se puede aplicar a la membrana. Después de la adición de las fracciones de muestras y la reacción con los antígenos inmovilizados derivados del ácido micólico con los anticuerpos contenidos en las muestras sobre la membrana, se añaden los anticuerpos secundarios marcados con oro coloidal en la membrana para que tenga lugar la agregación de las partículas de oro en la reacción antígeno-anticuerpo. En el caso de la agregación se forman puntos marrones o rojos visibles. La intensidad del punto es proporcional a la cantidad de reacciones entre el antígeno y el anticuerpo, es decir, a la cantidad de anticuerpos en la muestra pretratada. En el caso de que el sustrato de control presente una señal más intensa que el sustrato de ensayo es indicativo de tuberculosis activa en la persona de la que se deriva la muestra. Por otra parte, en el caso de que el sustrato de control no presente (o sea insignificante) una diferencia en la intensidad de color de la señal en comparación con el sustrato de control esto indica que el ser humano o animal del que se derivó la muestra no tiene tuberculosis activa.

40

45

50 Entre las distintas etapas de un ensayo de filtración con inmunotinción con oro la membrana se puede lavar con un tampón adecuado, por ejemplo, un tampón basado en PBS. Dicho tampón puede ser, por ejemplo, un tampón PBS/AE que comprenda NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y EDTA en agua a un pH fisiológico. Dicho tampón puede ser un tampón basado en PBS que consista en 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , y 1,05 g Na_2HPO_4 por litro de agua doble destilada desionizada que contenga 1 mM de EDTA y un 0,025 % (p/v) de azida sódica que se ajusta a un pH de 7,4.

55 En el caso de que se utilice el DIGFA, la membrana microporosa puede revestirse con dicho antígeno derivado del ácido micólico de una manera puntual. En un ensayo DIGFA las muestras pretratadas en las etapas i) a vi) se aplican en la membrana en forma de puntos. También se añaden los segundos anticuerpos marcados con oro en forma de puntos. En dicha realización, el sustrato de control y de ensayo son preferentemente la misma membrana

microporosa con puntos de antígeno derivados de ácido micólico inmovilizados en esta. El procedimiento de detección de la invención hace posible detectar tanto las fracciones de control como de ensayo en la misma membrana. Esto mejora la fiabilidad del ensayo y es más barato. Un ensayo DIGFA se prefiere particularmente debido a que se pueden inmovilizar en diferentes puntos sobre varias membranas distintos antígenos que se deriven de distintas cepas micobacterianas. De esta manera se hace posible proporcionar información sobre la cepa micobacteriana con la que se ha infectado el paciente. Otra ventaja de la utilización del DIGFA es que las muestras derivadas de diferentes personas sospechosas de tener tuberculosis activa se pueden comparar en un ensayo, debido a que el DIGFA hace posible la detección rápida y fiable de la interacción anticuerpo-antígeno en una cantidad ilimitada de puntos, dependiendo del tamaño de la membrana.

5 La detección de la unión de los anticuerpos y/u otro material al antígeno del ácido micólico, por ejemplo, la tinción roja en el caso del ensayo DIGFA que se utiliza como un procedimiento de detección, se puede llevar a cabo en un dispositivo automático. Distintos dispositivos automáticos serán conocidos para el experto en la técnica y el experto será capaz de seleccionar los medios de software adecuado para hacer la comparación de la etapa viii) del grado o extensión de unión entre los sustratos de ensayo y de control, en el que cualquier unión menor que se observe en el sustrato de ensayo es un indicador de la presencia de anticuerpos contra el antígeno en las muestras que se relacionan con tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se originan las muestras. En este contexto, se debería entender que menor se puede interpretar cualitativa o cuantitativamente, es decir, una unión menor puede interpretarse como que tiene menos eventos de unión, así como que tiene uniones más débiles.

10 La detección de la unión de los anticuerpos y/u otro material al antígeno del ácido micólico se puede llevar a cabo mediante una técnica de detección visual o cualquier otra técnica de detección adecuada. En una realización preferida particular, la detección por medio del ensayo *de punto final* tiene lugar visualmente, preferentemente a simple vista. Esto tiene la ventaja de la facilidad de la detección sin la necesidad de una tecnología de detección cara y complicada.

15 En el caso de que se utilice el DIGFA, la unión de los anticuerpos y/u otro material al antígeno del ácido micólico se puede evaluar por medios a simple vista.

20 La señal visual, por ejemplo, la tinción roja en el caso de que se aplique el ensayo DIGFA como ensayo *de punto final*, también se puede detectar con ayuda de una aplicación móvil, es decir, un programa de computadora diseñado para ejecutarse en dispositivos móviles tales como computadoras en tableta o teléfonos inteligentes. Por ejemplo, se puede utilizar una aplicación que esté diseñada para comparar la señal de unión del sustrato de control y de ensayo y que indique si el ser humano o animal del que se origina la muestra tiene tuberculosis activa.

Sistema

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema o dispositivo, preferentemente un sistema o dispositivo portátil, para llevar a cabo un procedimiento *de punto final* para la detección de un marcador de tuberculosis activa. El sistema se puede subdividir en 1) un sistema o dispositivo para el pretratamiento de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa con el fin de hacer la muestra adecuada para la detección con el procedimiento de la invención; y 2) un medio de detección para hacer posible la detección de la interacción de los anticuerpos contenidos en la muestra pretratada.

30 En otra realización, el sistema comprende al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico dispuesto y configurado para la recepción de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa; medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos un primera y una segunda corriente de muestra; estando dicho medio conectado corriente arriba o corriente abajo de dicho al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico; un recipiente adicional para la recepción de dicha primera corriente de muestra en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprenden un esteroil lipídico, y que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un recipiente más adicional para la recepción de la segunda corriente de muestra en una disposición paralela a dicho recipiente adicional y en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico; y que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y un primer sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la primera corriente de muestra y un segundo sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la segunda corriente de muestra.

35 En una realización particular, el sistema para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de la tuberculosis activa comprende al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico dispuesto y configurado para la recepción de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa; medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos un primera y una segunda corriente de muestra; estando dicho medio conectado corriente arriba o corriente abajo de dicho al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico; un recipiente adicional para la recepción de dicha primera corriente de muestra en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprenden un esteroil lipídico, y comprendiendo un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un recipiente más adicional y en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico; y que comprende un segundo sustrato que

no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y un primer sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recibir al menos parte de la primera corriente de muestra desde dicho primer recipiente adicional y un segundo sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la segunda corriente de muestra desde dicho recipiente más adicional, en el que el primer y segundo sustratos de detección son una membrana microporosa.

El primer y segundo sustrato de detección son preferentemente una membrana microporosa, preferentemente una membrana de nitrocelulosa. El primer y segundo sustratos de detección pueden tener en este caso puntos separadas, es decir, el primer y segundo puntos de detección, en la misma membrana. De esta manera se puede utilizar una y la misma membrana para la detección de la interacción anticuerpo/antígeno. Esto aumenta la fiabilidad de la detección y hace más fácil comparar la interacción detectada sobre el sustrato de ensayo y de control. Además, esto hace posible que se ensayen múltiples muestras al mismo tiempo.

Los sustratos de detección no tienen que estar en conexión física con los otros componentes del sistema. Por ejemplo, las muestras derivadas después de pasar por dichos recipientes adicional y más adicional se pueden almacenar hasta su uso posterior o para su transporte al sustrato de detección. De esta manera, en la práctica se tiene gran flexibilidad en la planificación de su ensayo. Por ejemplo, esto permite que se recolecten muestras pretratadas de varios sujetos, de manera que se puedan ensayar todas a la vez en un material de sustrato. Esto también hace más fácil ensayar las muestras de múltiples pacientes en las mismas condiciones.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un sistema o dispositivo, preferentemente un sistema o dispositivo portátil, para el pretratamiento de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa con el fin de hacer que la muestra sea adecuada para la detección en un procedimiento de detección que comprende al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico dispuesto y configurado para la recepción de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa; medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; estando dicho medio conectado corriente arriba o corriente abajo a dicho al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico; un recipiente adicional para la recepción de dicha primera corriente de muestra en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico, y que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un recipiente más adicional para la recepción de dicha segunda corriente de muestra en una disposición paralela a dicho recipiente adicional y en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico; y que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y un medio para el almacenamiento o transporte de las muestras tratadas. Este o estos medios no tienen que estar en conexión física con los recipientes que comprenden dicho primer y segundo sustrato respectivamente y se localizan corriente abajo de estos recipientes cuando el sistema se utiliza con el fin de recibir las fracciones de muestra pretratadas.

En una realización, el sistema o dispositivo para el pretratamiento de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa con el fin de hacer que la muestra sea adecuada para la detección con el procedimiento de la invención puede comprender dos columnas. Cada columna comprende dos compartimentos o recipientes. Un compartimento o recipiente superior comprende un sustrato revestido con un esteroil lipídico, por ejemplo, perlas revestidas con colesterol. Un compartimento inferior de una de las columnas comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico y un compartimento inferior de otra columna comprende un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico.

A este respecto, la invención también se refiere a un sistema para el pretratamiento de una corriente de muestra derivada de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa, que comprende medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; al menos una primera y segunda columna, configuradas para la recepción de dicha primera y segunda corriente de muestra respectivamente; comprendiendo dicha primera columna un compartimento que comprende un esteroil lipídico y una compartimento adicional que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico; y dicha segunda columna que comprende un compartimento que comprende un esteroil lipídico y un compartimento más adicional que comprende un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico; y medios para el almacenamiento o transporte de las muestras tratadas que se han pasado por dichas columnas. Este o estos medios para el almacenamiento y transporte no tienen que estar en conexión física con los recipientes que comprenden dicho primer y segundo sustrato respectivamente y se localizan corriente abajo de estos recipientes cuando el sistema se utiliza con el fin de recibir las fracciones de muestra pretratadas.

Este principio también se puede aplicar a un sistema para llevar a cabo un procedimiento *de punto final* de detección de un marcador de la tuberculosis activa. A este respecto, la invención también se refiere a un sistema para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa en una muestra derivada de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa, que comprende medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; al menos una primera y segunda columna, configuradas para la recepción de dicha primera y segunda corriente de muestra respectivamente; comprendiendo dicha primera columna un compartimento que comprende un esteroil lipídico y una compartimento

- adicional que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico; y dicha segunda columna que comprende un compartimento que comprende un esteroil lipídico y un compartimento más adicional que comprende un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico y un primer sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la primera corriente de muestra y un segundo sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la segunda corriente de muestra.
- Preferentemente, el sistema o dispositivo comprende un extremo que penetra la piel conectado con un primer tubo, que está dispuesto y configurado para la recepción de una muestra de sangre desde el extremo que penetra la piel y lleva dicha sangre desde el sitio de la piel a dicho recipiente/compartimento que comprende un esteroil lipídico.
- En otra realización preferida, el sistema o dispositivo comprende una unidad de filtro en conexión con dicho primer tubo para la recepción de la muestra de sangre y se configura para separar el plasma de dicha muestra de sangre completa.
- En una realización adicional, el sistema o dispositivo comprende un extremo que penetra la piel conectado a un primer tubo que está dispuesto y configurado para la recepción de una muestra de sangre desde el extremo que penetra la piel; una unidad de filtro en conexión con dicho primer tubo para la recepción de dicha muestra de sangre y configurado para separar el plasma de dicha muestra de sangre completa; un primer recipiente para la recepción de dicha muestra, comprendiendo dicho primer recipiente un esteroil lipídico; medios para la división de dicha muestra en al menos una segunda y una segunda corriente de muestra; un segundo recipiente para la recepción de dicha primera corriente de muestra, comprendiendo dicho recipiente un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un tercer recipiente para la recepción de dicha segunda corriente de muestra, comprendiendo dicho recipiente un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; y un medio para el almacenamiento o transporte de las muestras tratadas.
- La corriente a través del sistema o dispositivo se dirige preferentemente mediante una bomba, preferentemente una bomba de flujo continuo, por ejemplo, una bomba peristáltica o una bomba de diafragma. En el caso de que se apliquen columnas, la corriente puede ser dirigida por la acción de la gravedad o por capilaridad.
- Los medios de penetración de la piel puede ser cualquier medio adecuado para obtener una muestra de sangre de un ser humano o animal, tal como una aguja de jeringa o similar.
- El primer tubo tiene unas dimensiones que son adecuadas para el fin del dispositivo, es decir, necesita que sea bien adaptable al medio de penetración de la piel y el primer recipiente.
- Los componentes del sistema o dispositivo, es decir, los recipientes, medios de dilución, unidad de filtro y biosensor pueden estar interconectados por tubos de intercomunicación adecuados. De manera alternativa, los componentes del dispositivo se pueden diseñar de manera que se puedan conectar directamente entre ellos, y separarse por filtros, por ejemplo, a través de los cuales pueda pasar selectivamente la muestra, pero no el sustrato. El material de los tubos que se utilizan en la invención puede ser de cualquier material adecuado que sea conocido por el experto en el campo del ensayo de muestras de sangre. Los materiales adecuados son inertes para los componentes de la sangre/plasma/suero e incluyen politetrafluoroetileno (por ejemplo, Teflon®), polipropileno, poliéter cetona (PEEK) y polietileno.
- Los componentes adicionales pueden conectarse entre los componentes del dispositivo. Dichos componentes adicionales pueden conectarse por tubos que interconectan los componentes directamente unidos a los componentes.
- El sistema o sub-dispositivo para llevar a cabo las etapas i-v de los procedimientos de la invención también puede comprender un medio para la dilución de la sangre o el plasma. Dicho medio se puede implementar antes del recipiente que contiene el esteroil lipídico, antes de la unidad de filtro, entre la unidad de filtro y el recipiente que contiene el esteroil lipídico, entre el recipiente que contiene el esteroil y los otros recipientes (adicional y más adicional o segundo y tercero) o entre el adicional/más adicional o segundo/tercer recipiente y los medios de almacenamiento y transporte. Por ejemplo, se puede implementar un recipiente de 10 ml en la salida del adicional o segundo y más adicional o tercer recipientes. Puede haber ya un tampón adecuado en el recipiente o se puede añadir a este recipiente para proporcionar la dilución deseada. De esta manera el volumen de la muestra se mantiene lo más bajo posible durante la mayoría de las etapas de los procedimientos de la invención, lo que es beneficioso para la velocidad del procedimiento y la compactibilidad del dispositivo.
- La unidad de filtro puede comprender una matriz de filtro. Preferentemente, el filtro se implementa sobre un microchip de filtro para la compactibilidad.
- Los recipientes pueden ser vasos o un canal o tubos, tal como un canal en espiral o un tubo en espiral. Se prefiere un canal o tubo en espiral debido a que dicha estructura ocupa poco espacio mientras se mantiene un largo tramo de flujo. Un canal o tubo en espiral se puede implementar ventajosamente en un microchip. Esto contribuye a la

compactibilidad del dispositivo de la invención. El término "recipiente" se tienen que interpretar en un sentido amplio, es decir, se puede ver como una área definida en otra unidad, es decir, un compartimento, por ejemplo, un compartimento en una columna. Los términos "recipiente" y "compartimento" se pueden por lo tanto utilizar de manera intercambiable en la presente invención. Lo que importa es que el recipiente que contiene el esteroil lipídico y los otros recipientes (el adicional y más adicional o segundo y tercero) estén espacialmente separados. A este respecto, se puede incluir un recipiente que contenga un esteroil en una columna junto con dicho recipiente adicional (o segundo) mientras que se incluye otro recipiente que contiene un esteroil en una columna junto con un recipiente más adicional (o tercero). En el contexto de la invención, una columna para la preparación de una corriente que se va a ensayar en un sustrato de ensayo puede comprender un sustrato superior (o corriente arriba) revestido con un esteroil lipídico que esté separado por una barrera de, pero en conexión fluida con un sustrato inferior (o corriente abajo) revestido con antígenos derivados del ácido micólico. Una columna para la preparación de una corriente que se va a ensayar en un sustrato de control puede comprender un sustrato superior (o corriente arriba) revestido con un esteroil lipídico que esté separado por una barrera de, pero en conexión fluida con un sustrato inferior (o corriente abajo) no revestido con antígenos derivados del ácido micólico. Se tiene que entender que en conexión en este contexto significa que la muestra que se va a ensayar puede pasar a través de dicha barrera, mientras que la barrera no permite el paso de los sustratos. Los sustratos adecuados para dichas columnas son perlas. A este respecto, una realización del sistema de la invención para el pretratamiento de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa con el fin de hacer que la muestra sea adecuada para la detección con el procedimiento de la invención comprende al menos una primera y una segunda columna, configuradas para la recepción de dicha primera y segunda corriente de muestra respectivamente, comprendiendo dicha primera columna un recipiente que comprende un esteroil lipídico y comprendiendo dicho recipiente adicional un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y comprendiendo dicha segunda columna un recipiente que comprende un esteroil lipídico y comprendiendo dicho recipiente más adicional un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico.

El material de los recipientes es preferentemente el mismo y los materiales adecuados pueden ser cristal bk-7, politetrafluoroetileno, polipropileno, poliéter cetona o polietileno. La frontera entre los dos recipientes puede ser un filtro que no permita que pase el material de sustrato, pero que permita el paso de una corriente de muestra. Los sustratos de los recipientes tienen que ser de un material que sea inerte para la unión no específica de las moléculas de la muestra, por ejemplo, cristal bk-7, politetrafluoroetileno, polipropileno, poliestireno, poliéter cetona o polietileno. Los sustratos pueden estar en forma de perlas, opcionalmente perlas reticuladas, por ejemplo, perlas de poliestireno.

Los sistemas de la invención comprenden un recipiente que comprende un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico (segundo recipiente) y un recipiente que comprende un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico. En vez de un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico, el último recipiente puede tener un revestimiento inerte o ningún revestimiento, a condición de que no tenga lugar una unión no específica.

El medio de almacenamiento o transporte de las muestras tratadas pueden ser pequeños viales en los que se almacenan las muestras para su análisis posterior, por ejemplo, por medio de un ensayo de filtración con inmunotinción puntual con oro. De manera alternativa, el medio puede estar formado por una pipeta que se puede aplicar para transferir las fracciones de muestra tratadas en las etapas i)-v) de los procedimientos de la invención a los sustratos con antígenos derivados del ácido micólico del ensayo *de punto final*, por ejemplo, a las fracciones puntuales como puntos en un ensayo de filtración con inmunotinción puntual con oro.

El dispositivo de la invención se puede conectar con cualquier medio de análisis automático, tal como una computadora con programas de software para llevar a cabo la comparación de la unión de los anticuerpos del ácido micólico respecto a los antígenos inmovilizados en las cámaras del biosensor.

Una realización ejemplar del sistema de acuerdo con la reivindicación 32 se muestra en la Fig. 2.

La Fig. 2 muestra una aguja 1 de penetración en la piel conectada a un primer tubo 102, que está dispuesto y configurado para la recepción de la sangre desde la aguja 101 y que lleva la cantidad de sangre lejos del sitio de la piel. El tubo 101 está conectado a una unidad de filtro 103. Esta unidad de filtro sirve para separar el plasma de dicha muestra de sangre completa. La unidad de filtro 103 se conecta mediante un tubo 113 a un primer recipiente 14 que tiene la forma de un canal en espiral cuya pared interior está revestida con un esteroil lipídico. El canal en espiral se conecta mediante el tubo 114 con un medio para la división del plasma 105 en forma de un punto de ramificación con una válvula pasiva. Una rama del punto de ramificación se conecta mediante un tubo 116 con un segundo recipiente 106 para la recepción de una primera corriente de plasma, que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico. La otra rama del punto de ramificación se conecta mediante un tubo 115 con un tercer recipiente 107 para la recepción de una segunda corriente de plasma, que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico. Los recipientes 106 y 107 en esta realización tienen forma de un canal en espiral cuya pared interior está revestida con un antígeno derivado del ácido micólico (recipiente 106) o no revestido con un antígeno derivado del ácido micólico (recipiente 107). Los recipientes 106 y 107 están conectados mediante el tubo 117 y 118 respectivamente con los recipientes de dilución 111 y 112, respectivamente. Estos recipientes pueden precargarse con un tampón de dilución adecuado o comprenden las entradas 121, 122 para la introducción del tampón de dilución. Los recipientes de dilución 121 y 122

se pueden conectar mediante los tubos 119 y 120 respectivos a los medios de almacenamiento o transporte 108 y 109, respectivamente. De manera alternativa, los recipientes de dilución 121 y 122 se pueden conectar mediante los tubos 119 y 120 respectivos a los sustratos de ensayo y de control con los antígenos inmovilizados derivados del ácido micólico que se ensayan en un ensayo *de punto final*.

5 Kit

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para su uso en el diagnóstico de la tuberculosis o el pretratamiento de las muestras para el diagnóstico de tuberculosis, que comprende uno o más medios de penetración de la piel; uno o más tubos; uno o más recipientes revestidos con un esteroil lipídico y opcionalmente fosfatidil colina, pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina; uno o más recipientes que comprenden un sustrato con un antígeno derivado del ácido micólico; uno o más recipientes que comprenden un sustrato sin un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico; opcionalmente uno o más recipientes para el transporte y almacenamiento de las muestras; opcionalmente medios para la dilución de la sangre o plasma y/o una unidad de filtro; al menos una membrana microporosa con un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico sobre la misma, y opcionalmente anticuerpos secundarios que se unan a la cadena pesada de los anticuerpos contra los antígenos derivados del ácido micólico contenidos en una muestra derivada de un ser humano o animal sospechosos de tener tuberculosis activa, preferentemente anticuerpos secundarios marcados con oro coloidal.

En una Realización preferida el kit comprende: uno o más medios de penetración de la piel; uno o más tubos; una o más columnas que comprenden un compartimento que comprende un sustrato revestido con un esteroil lipídico y opcionalmente fosfatidil colina, pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina; y un compartimento que comprende un sustrato revestido con un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico bajo dicho compartimento que comprende un sustrato revestido con esteroil lipídico; una o más columnas, que comprenden un compartimento que comprende un sustrato revestido con un esteroil lipídico y opcionalmente fosfatidil colina, pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina; y un compartimento que comprende un sustrato revestido sin un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico bajo dicho compartimento que comprende un sustrato revestido con esteroil lipídico, opcionalmente uno o más recipientes para el transporte y almacenamiento de muestras, opcionalmente medios para diluir la sangre o plasma y/o una unidad de filtro; opcionalmente al menos una membrana microporosa con un antígeno derivado del ácido micólico inmovilizado en ella, y opcionalmente anticuerpos secundarios que se unan a la cadena pesada de los anticuerpos contra los antígenos derivados del ácido micólico contenidos en la muestra derivada de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis.

El kit puede comprender uno o más medios para transferir fracciones de la muestra pretratada de acuerdo con las etapas i) a v) de los procedimientos de la invención a la membrana microporosa, por ejemplo, una pipeta y accesorios de la pipeta, tal como las puntas de pipeta.

El kit también puede comprender uno o más medios para almacenar las fracciones de muestra pretratadas de acuerdo con las etapas i) a v) para su uso posterior, tal como viales o tubos.

El kit puede también comprender herramientas para ensamblar los componentes tales como tornillos, pinzas, pegamento, cinta, destornilladores, etc.

El kit también puede comprender medios para la dilución de la sangre o el plasma durante el análisis de sangre, tal como recipientes (por ejemplo, de 10 ml) que se pueden implementar en la salida del segundo y tercer recipiente. Puede haber ya un tampón adecuado en el recipiente o se puede añadir a este recipiente para proporcionar la dilución deseada.

Los componentes del kit hacen posible que la persona que va a llevar a cabo un ensayo de diagnóstico de tuberculosis monte el dispositivo de la invención *de punto final*, es decir en el punto de atención. Por lo tanto, se va a entender que los componentes del kit tienen las mismas características y propiedades preferidas que se han explicado anteriormente para los sistemas de la invención. Los sistemas de la invención son fáciles de montar mediante los componentes del kit de la invención, es decir, no se necesita un respaldo técnico especialista. El kit puede estar provisto convenientemente con instrucciones de montaje y uso.

Esteroles lipídicos

El esteroil lipídico que se utiliza en el contexto de la invención es preferentemente el colesterol o un derivado del mismo. El esteroil lipídico también puede ser un fosfolípido modificado con un esteroil. Dicho lípido modificado con esteroil puede ser un fosfolípido modificado con esteroil, por ejemplo, un lípido fosfatidilcolina modificado con esteroil o glicerofosfolípido. En dicho lípido modificado con esteroil, el esteroil preferentemente es colesterol. Un buen ejemplo de un lípido modificado con un esteroil adecuado para los fines de la invención es el 1-palmitoil-2-colesteril carbonil-sn-glicero-3-fosfocolina.

El esteroil lipídico se inmoviliza preferentemente sobre una superficie. Un ejemplo de un sustrato que tiene un revestimiento que contiene colesterol o éster de colesterol en el que el éster de colesterol es linoleato, en el que la relación de peso de ácido linoleico respecto a colesterol está en el intervalo de desde 1:3 a 1:20.

También se puede revestir un sustrato con un esteroil lipídico, preferentemente colesterol, en combinación con otras moléculas.

5 Preferentemente dicho esteroil lipídico es el colesterol inmovilizado en un sustrato junto con fosfatidil colina. El esteroil lipídico depura los anticuerpos anti-colesterol de la sangre/plasma/suero que de otra manera reaccionarían de manera cruzada con los antígenos de ácido micólico del sustrato y darían lugar a un diagnóstico positivo falso de tuberculosis. La fosfatidil colina se unirá a los materiales hidrófobos de la muestra de sangre haciendo que la muestra sea más hidrófila después de la exposición. La muestra hidrófila resultante será más fácil de manejar en las etapas posteriores del procedimiento y con menos tendencia a la coagulación.

10 En una realización, se inmoviliza un esteroil lipídico, preferentemente colesterol en conjunto con pectina sobre un sustrato, por ejemplo, la pared interior de un tubo. En esta realización, el esteroil lipídico depura los anticuerpos anti-colesterol de la sangre/plasma/suero que de otra manera reaccionarían de manera cruzada con los antígenos de ácido micólico del sustrato y darían lugar a un diagnóstico positivo falso de tuberculosis. Además, la pectina mantiene apartado el colesterol de la muestra y con este también los anticuerpos del colesterol. Esto da lugar a una fiabilidad aún mayor de la detección.

15 De manera alternativa, un esteroil lipídico, preferentemente el colesterol se inmoviliza junto con un compuesto de unión al colesterol en la muestra derivada de la sangre, tal como un heteropolisacárido de unión al colesterol, tal como β -ciclodextrina, pectina, anfotericina B o dextrina. Dichas moléculas depuran el colesterol de la muestra y con este también los anticuerpos del colesterol. Esto da lugar a una fiabilidad aún mayor de la detección.

20 Por ejemplo, un esteroil lipídico, preferentemente el colesterol, se inmoviliza con β -ciclodextrina o pectina, anfotericina B sobre un sustrato tal como membranas de polipropileno de fibra hueca o cristal.

25 Se conocen muchos procedimientos para inmovilizar un esteroil lipídico, en particular, el colesterol sobre un sustrato. El experto en la técnica será capaz de seleccionar el protocolo adecuado para su revestimiento particular. Por ejemplo, se puede aplicar un revestimiento disolviendo inicialmente el colesterol en un disolvente orgánico y diluyendo adicionalmente el colesterol disuelto en una solución de etanol, permitiendo que la solución se evapore en el lugar dentro de un recipiente, se aclara el recipiente con solución salina tampón, se seca al aire el recipiente, y se sella el recipiente en fundas a prueba de vapor con un desecante.

Antígenos derivados del ácido micólico

30 El antígeno derivado del ácido micólico puede derivarse de una micobacteria seleccionada de entre micobacterias virulentas y patógenas. Preferentemente, el antígeno del ácido micólico se deriva de *Mycobacterium tuberculosis*. Dicho antígeno derivado del ácido micólico es al menos uno que se selecciona de entre el grupo de ácido micólico, factor cordal, ácido micólico modificado químicamente, factor cordal modificado químicamente, un derivado sintético del ácido micólico, un derivado sintético del factor cordal.

35 Las fuentes naturales de derivados de ácido micólico incluyen las paredes celulares de micobacterias tal como *Mycobacterium tuberculosis* incluye mezclas de diferentes clases de compuestos y diferentes homólogos del ácido micólico, a menudo como derivados que se unen a la pared de la célula.

40 Además del propio ácido micólico, las células micobacterianas también contienen compuestos derivados del ácido, tales como ésteres de azúcares de ácidos micólicos. Los ésteres de azúcares de origen natural comprenden, por ejemplo, trealosa-6,6'-dimicolato, al que se hace referencia comúnmente como TDM, que se conoce también como "factores cordales"; y monomicolatos de trealosa (a los que se hace referencia a menudo como TMM). Estos ésteres de azúcares se encuentran en la naturaleza como mezclas complejas de diferentes clases de ácido micólico y de diferentes homólogos dentro de cada clase.

45 Debido a que es difícil establecer la identidad de los factores cordales presentes en los productos naturales y separar cada especie molecular individual, se prefiere utilizar derivados del ácido micólico semisintéticos o más preferentemente sintéticos para los fines de la invención. Además, se sabe que la estructura de la unidad de ácido micólico afecta a la actividad biológica del factor cordal. Por lo tanto, cuando se utilicen los derivados naturales del ácido micólico en la presente invención, la diferencia entre la actividad biológica entre estos derivados y, por lo tanto, la detección de la unión de los anticuerpos al antígeno de la muestra puede transmitir un factor de impredecibilidad e incertidumbre al resultado de la detección. Además, las desviaciones de la preparación de los derivados naturales del ácido micólico pueden dar como resultado problemas con respecto a la reproducibilidad de diferentes lotes de ensayo.

50 Por lo tanto, con el fin de ser capaces de proporcionar una detección con alta fiabilidad y resultados reproducibles se prefiere el uso de derivados del ácido micólico semisintéticos o incluso más preferentemente sintéticos que sean idénticos o estrechamente análogos a los compuestos sencillos que se encuentran en las mezclas naturales.

55 Los derivados semisintéticos adecuados incluyen los factores cordales semisintéticos que se pueden preparar uniendo los ácidos micólicos al grupo del azúcar. Estos factores semisintéticos sin embargo siguen conteniendo mezclas de homología diferente.

5 Por lo tanto, los derivados del ácido micólico adecuados para su uso en el contexto de la presente invención son factores cordales sintéticos, por ejemplo, los factores cordales sintéticos descritos en el documento WO 2010/08667, es decir, compuestos de fórmula $(M)_x (S)_y (M')_z$, en la que x es de 1 a 6, y es de 1 a 12, z es de 0 a 10, cada uno de M y cada uno de M' es independientemente un resto de ácido micólico que incluye un resto de β -hidroxiácido y cada una de S es una unidad de monosacárido.

El antígeno del ácido micólico puede estar en una forma de entre mezclas homogéneas y heterogéneas de compuestos. El antígeno derivado del ácido micólico puede, por ejemplo, utilizarse en combinación con un fosfolípido tal como la fosfatidilcolina.

10 El antígeno del ácido micólico puede inmovilizarse sobre los sustratos de varias maneras que son conocidas por el experto. Los antígenos derivados del ácido micólico sintético se pueden sintetizar con grupos activos particulares que hagan posible la inmovilización en un material de sustrato.

Por ejemplo, para la inmovilización en sílice, se puede aplicar una química de acoplamiento en silano.

15 En el caso de un sustrato de nitrocelulosa el antígeno derivado del ácido micólico se puede inmovilizar adecuadamente de la siguiente manera. Los antígenos derivados del ácido micólico se pueden obtener en forma liofilizada y reconstituirse en una mezcla de disolvente, por ejemplo, una mezcla de cloroformo:metanol: agua, y se diluyen hasta una concentración en el orden de varios nanomoles, por ejemplo, 1 nM. Esta dilución se puede aplicar puntualmente en una membrana de nitrocelulosa, en la que cada punto está separado una distancia predeterminada, por ejemplo, 1 cm. Tras el secado de los puntos los antígenos derivados del ácido micólico se inmovilizan en la membrana. Los procedimientos de inmovilización alternativo pueden implicar, por ejemplo, la disolución de los antígenos en hexano o PBS caliente para formar una solución de revestimiento con el antígeno antes de la aplicación puntual de la solución sobre la membrana.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos tienen significado para ilustrar el principio de la invención y no se deberían interpretar como limitantes del ámbito de las reivindicaciones. En el ejemplo, se ensayó una muestra de suero humano en cuanto a los anticuerpos contra los derivados del ácido micólico en un ensayo ELISA. Como procedimiento de detección se escogió un ensayo ELISA debido a que es menos sensible por ejemplo que una resonancia de plasmones superficiales o una espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) o una resonancia de anillo (interferometría). Por lo tanto, se puede concluir que, si se obtienen resultados satisfactorios con el ELISA, también se obtendrán con procedimientos de detección más sensibles.

30 Materiales:

- Muestra (plasma o suero humano)
- Filtros de centrifugación de 0,2 micrómetros (Whatman)
- Perlas acopladas a colesterol y ácido micólico
- Policlonales de ácido micólico disueltos en hexano
- 35 • Placas de ELISA de poliestireno
- PBS
- Tampón de bloqueo: Caseína al 0,5 % en PBS
- Solución de sustrato de ELISA TMB ultra de 1 etapa (Thermo Scientific)
- Ácido sulfúrico 2 M
- 40 • Anticuerpo secundario: de conejo anti-Ig humana con HRP (DAKO)

Procedimientos

Revestimiento de las placas de ELISA

45 Se añadieron 50 μ l de hexano con policlonales de ácido micólico a una concentración de 3 pg/ml a las placas de ELISA de 96 pocillos. Se utilizó el hexano sin ácido micólico como control. Se incubaron las placas durante 24 h a 4 °C y posteriormente se lavaron dos veces con PBS.

Preparación de las perlas

En el presente ejemplo, se utilizaron perlas como sustratos representativos del sustrato mencionado en las etapas ii), iv y v) de los procedimientos de la invención.

50 Para el fin de este ejemplo, se utilizaron perlas Toyopearl AF-Amino-650M (Tosoh Bioscience). Se prepararon las perlas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como colesterol, se conjugó el 7-ceto colesterol con las perlas básicamente como se describe en Abdel-Magid AF y col. (Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. J. Org. Chem. 1996:61;3849-3862) mezclando el 7-ceto colesterol (100 mg, 0,25 mmol) y una lechada de Toyopearl (2,5 ml, 0,25 mmol de grupos reactivos) en acetonitrilo (3,5 ml) seguido por el tratamiento con triacetoxi borhidrato sódico (80 mg,

0,375 mmol). La mezcla se agitó a TA bajo una atmósfera de N₂ durante 1,5 h. Tras lo cual, se inactivó la mezcla añadiendo NaHCO₃ acuosa saturada. Las perlas se lavaron completamente con H₂O, 1 M de NaCl, y finalmente H₂O para retirar el exceso de ligando. Después de esto, se acetilaron los grupos amino residuales añadiendo 8 ml de acetato sódico 0,2 M y 4 ml de anhídrido acético a la resina a 0 °C durante 30 minutos seguido por la adición de otros 4 ml de anhídrido acético y una incubación a 25 °C durante 30 minutos.

Como ácidos micólicos se utilizó una mezcla de isoformas de origen natural de ácido micólico (Pm ~1100-1300) para acoplarse a las perlas básicamente como se describe en Law B, Jenner WN. *Immunoassay: A Practical Guide*. London: Taylor & Francis. 2005: p 11-31 y Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. 3ª ed. London; Elsevier. 2013: p 535-545. En resumen, se añadieron hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl) (57,7 mg, 0,3 mmol (1,2 equiv.)) y N,N-diisopropiletil-amina (DIPEA) (81,3 mg, 0,625 mmol (2,5 equiv.)) a una solución de amina (Toyopearl aminoactivadas, 2,5 ml, 0,25 mmol de grupos reactivos), ácido (ácido isolitocólico: 93,8 mg, 0,25 mmol (1 equiv.)/ Ácidos micólicos: 300 mg, 0,25 mmol (1 equiv.)) y HOBt hidrato de (1-Hidroxibenzotriazol) (40,5 mg, 0,3 mmol (1,2 equiv.)) en DMF (2,5 ml (10 ml/1 mmol)) y agitado/removido durante 24 horas a temperatura en nitrógeno. El disolvente se retiró por evaporación y las perlas se lavaron utilizando agua y NaCl 1 M y agua. El exceso de grupos amino (no unidos) se bloquearon utilizando acetilación. Las perlas se lavaron utilizando agua, NaCl 1 M y agua. Primero se crea una atmósfera inerte con nitrógeno o argón. El orden de los reactivos: Ácidos micólicos con DMF (a 0 °C), luego (HOBt), 10 min después las perlas, 10 min después la base (DIPEA) y finalmente 15 min después EDC.

Preparación de la muestra

El suero de seres humanos de los que se sabía que padecían tuberculosis se diluyó en tampón de bloqueo 1:5. Las muestras utilizadas se derivado de pacientes positivos a los frotis y negativos en los frotis. Las dos fracciones de 0,5 ml se obtuvieron y transfirieron cada una a un filtro de centrifugación de 0,2 micrómetros y se centrifugó a 10000 g. El flujo directo se agrupó en tampón de bloqueo desde 1:5 a 1:20.

Se añadieron 250 µl del flujo directo a las perlas que se habían revestido con colesterol, policlonales de ácido micólico o agente de bloqueo. Las perlas se agitaron a temperatura ambiente. Después de la incubación, las perlas se centrifugaron rápido y se utilizó el sobrenadante como muestra. El pretratamiento total de las muestras con las perlas (en línea con las etapas i-v) del procedimiento de la invención en este conjunto particular puede tener lugar en menos de 10 minutos después de los cuales el análisis puede seguir directamente.

Procedimiento de ELISA

Para bloquear la unión no específica de los anticuerpos con los ácidos micólicos en los pocillos de las placas de ELISA, se añadieron 300 µl de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora. Posteriormente, se reemplazó el tampón de bloqueo con 45 µl de muestra. Se utilizó el tampón de bloqueo como control negativo. Después de la incubación, se lavaron las placas tres veces con PBS. El tampón de lavado PBS se reemplazó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP en tampón de bloqueo. Después de la incubación, se lavó la placa tres veces con PBS. Posteriormente, se añadieron 50 µl por pocillo de solución de sustrato TMB de ELISA a los pocillos y se incubó durante 15-30 min a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 50 µl por pocillo de 2 M de ácido sulfúrico. Se midió la absorbancia a 450 nm. Para cuantificar la unión de los anticuerpos a los sustratos de ácido micólico de la placa de ELISA.

Tratamiento de las muestras

Las muestras se trataron de la siguiente manera.

1. En un primer estudio de comparación, se tomaron dos fracciones (1 y 2) de cada una de las 6 muestras derivadas de diferentes seres humanos. Todas las fracciones se incubaron por separado con perlas sin ningún agente acoplado (fracción 1 y 2) y se almacenaron hasta la detección por ELISA. La media de señal obtenida por ELISA de cada fracción se determinó. Ambas fracciones tenían los mismos resultados. La señal de ELISA de estas dos fracciones se fijó en el 100 %.

2. En un segundo estudio de comparación, se tomaron dos fracciones (3 y 4) de cada una de las 6 muestras mencionadas anteriormente. Las muestras de la fracción 3 se incubaron por separado con perlas acopladas con solo el agente de bloqueo y posteriormente se almacenaron hasta la detección por ELISA. Las muestras de la fracción 4 se incubaron por separado con perlas acopladas con colesterol y posteriormente se almacenaron hasta la detección por ELISA.

3. En un tercer estudio de comparación, se tomaron dos fracciones (5 y 6) de cada una de las 6 muestras mencionadas anteriormente. Las muestras de la fracción 5 se incubaron por separado con perlas acopladas con colesterol y posteriormente se almacenaron hasta la detección por ELISA. Las muestras de la fracción 6 se incubaron por separado con perlas acopladas con colesterol, posteriormente las muestras se centrifugaron y se utilizaron los sobrenadantes para una segunda incubación con perlas acopladas con policlonales de ácido micólico. Las muestras se almacenaron posteriormente hasta la detección por ELISA.

4. En un estudio de comparación adicional, se tomaron dos fracciones (7 y 8) de cada una de las 6 muestras mencionadas anteriormente. Ambas fracciones 7 y 8 se incubaron con perlas acopladas con colesterol y perlas

como sustrato acopladas con los policlonales de ácido micólico simultáneamente y posteriormente se almacenaron hasta la detección por ELISA.

Excepto por las diferencias de las perlas todas las demás condiciones eran las mismas para todos los tratamientos.

Resultados

- 5 Se determinó la media de señal obtenida por ELISA de cada fracción de las 6 muestras. La señal de ELISA de las fracciones 1 y 2 era la misma y se fijó en el 100 %. La señal de ELISA de las otras fracciones se muestra en porcentajes de señal de la fracción 1 (o 2) en la Tabla I posterior.

Tabla I Resultados de ELISA

Fracción	Señal de ELISA
Fracción 1	100 %
Fracción 2	100 %
Fracción 3	81 %
Fracción 4	68 %
Fracción 5	73 %
Fracción 6	54 %
Fracción 7	96 %
Fracción 8	96 %

- 10 Estos resultados muestran que las muestras que se exponen primero a un esteroil lipídico y posteriormente a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico (las muestras de la fracción 6) tienen una señal de ELISA menor que cualquiera de las otras fracciones ensayadas. Se puede ver una clara diferencia entre las fracciones 5 y 6, que se puede ver en el estudio de comparación como una realización ejemplar del procedimiento *de punto final* de detección de un marcador de tuberculosis activa de acuerdo con la invención. Sorprendentemente,
- 15 la baja señal de ELISA obtenida de la fracción 6 no se puede obtener incubando una muestra con perlas acopladas con colesterol y perlas acopladas con policlonales de ácido micólico: simultáneamente. De hecho, las señales de ELISA de las fracciones 7 y 8 son incluso más altas que la señal de ELISA de las perlas acopladas con el agente de bloqueo solo o las perlas acopladas con colesterol. También se obtuvieron resultados no satisfactorios cuando se exponía una fracción a perlas acopladas con ácido micólico solo. A partir de esto, parece que es importante que el
- 20 pretratamiento de una muestra tenga lugar en las dos etapas siguientes de 1) exposición a un esteroil lipídico y 2) exposición a un derivado del ácido micólico para obtener el descenso más brusco de la señal y por lo tanto de unión de anticuerpos en comparación con una muestra de control que no se ha expuesto al derivado de ácido micólico.

- Además, a partir del ejemplo se consigue que el pretratamiento total de las muestras con las perlas (en línea con las etapas i)-v) del procedimiento de la invención en este conjunto particular pueda tener lugar en menos de 10 minutos
- 25 después de los cuales el análisis puede seguir directamente. El tiempo necesario para el análisis depende del ensayo de detección que se aplique. Como se ha mencionado anteriormente, en vez del análisis con ELISA, son posibles otros ensayos de detección. Las muestras pretratadas como se ha descrito anteriormente se pueden analizar utilizando cualquier tecnología de marcador libre adecuada. El inventor ha descubierto en particular que cuando se aplica la detección por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) la unión de los anticuerpos
- 30 presentes en las muestras de los sustratos de detección puede tener lugar en segundos. Esto hace posible determinar si un individuo está infectado o no con tuberculosis activa de una manera rápida y fiable, permitiendo la detección de tuberculosis en menos de 10 minutos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa en una muestra proporcionada a partir de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa que comprende las etapas de:
- ii) la exposición de dicha muestra a un esteroil lipídico en el que dicho esteroil lipídico está inmovilizado en un sustrato, en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo, y en el que dicho esteroil lipídico depura de la muestra los anticuerpos anti-colesterol;
 - iii) la obtención de al menos dos fracciones de dicha muestra ya sea antes o después de su exposición a dicho esteroil lipídico;
 - iv) la exposición de la primera de dichas fracciones expuestas a un esteroil lipídico a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
 - v) la exposición de la segunda de dichas fracciones expuestas a un esteroil lipídico a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
 - vi) la exposición de la fracción de muestra expuesta en la etapa iv) a un sustrato de ensayo que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico y someter la fracción de muestra expuesta en la etapa v) a un sustrato de control que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;
 - vii) la detección de la unión de anticuerpos al antígeno de la etapa vi) en tiempo real; y
 - viii) la comparación del grado o extensión de la unión entre los sustratos de ensayo y de control, siendo cualquier unión menor observada al sustrato de ensayo un indicador de la presencia de anticuerpos contra el antígeno en la muestra lo que indica tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se origina la muestra.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la detección se lleva a cabo utilizando una resonancia de plasmones superficiales o espectroscopia de impedancia electroquímica, calorimetría de titulación isotérmica, interferometría de biocapa, rejillas ópticas, cristal fotónico, perfil de resonancia acústica, microequilibrios de cristal de cuarzo o utilizando un chip biosensor que utiliza un resonador en anillo de Si.
3. Un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa en una muestra proporcionada a partir de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa que comprende las etapas de:
- ii) la exposición de dicha muestra a un esteroil lipídico en la que el esteroil lipídico está inmovilizado en un sustrato, en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo, y en el que dicho esteroil lipídico depura de la muestra los anticuerpos anti-colesterol;
 - iii) la obtención de al menos dos fracciones de dicha muestra ya sea antes o después de su exposición a dicho esteroil lipídico;
 - iv) la exposición de la primera de dichas fracciones expuestas a un esteroil lipídico a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;
 - v) la exposición de la segunda de dichas fracciones expuestas a un esteroil lipídico a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico; o el almacenamiento de al menos parte de la segunda de dichas fracciones hasta la etapa vi), saltándose la etapa de exposición de la segunda de dichas fracciones a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;
 - vi) la exposición de al menos parte de la fracción de muestra expuesta en la etapa iv) a un sustrato de ensayo que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico y la exposición de al menos parte de la fracción de muestra expuesta o almacenada en la etapa v) a un sustrato de control que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;
 - vii) la detección de la unión de anticuerpos al antígeno de la etapa vi) en un ensayo de punto final de punto final; y
 - viii) la comparación del grado o extensión de la unión entre los sustratos de ensayo y de control, siendo cualquier unión menor observada al sustrato de ensayo un indicador de la presencia de anticuerpos contra el antígeno en la muestra lo que indica tuberculosis activa en el ser humano o animal del que se origina la muestra.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el ensayo de punto final de punto final se selecciona de entre el grupo que consiste en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), transferencia de Western, ensayo de marcado radioactivo, ensayo fotospectrométrico, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, espectroscopia de impedancia electroquímica, un ensayo de filtración con inmunotinción con oro, o un ensayo de inmunotinción puntual con oro (DIGFA); y/o en el que la detección da lugar a una señal visual que se analiza por medio de una aplicación de móvil que está diseñada para comparar la señal de unión de los sustratos de control y de ensayo y que indica si el ser humano o animal del que se origina la muestra tiene tuberculosis activa.
5. Un procedimiento de pretratamiento de una muestra proporcionada a partir de un ser humano o animal sospechoso de tener una tuberculosis activa para la detección de un marcador de tuberculosis activa en dicha muestra, que comprende las etapas de:
- ii) la exposición de dicha muestra a un esteroil lipídico en el que dicho esteroil lipídico está inmovilizado en un sustrato, en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo, y en el que dicho esteroil lipídico depura de la muestra los anticuerpos anti-colesterol;
 - iii) la obtención de al menos dos fracciones de dicha muestra ya sea antes o después de su exposición a dicho

esterol lipídico;

iv) la exposición de la primera de dichas fracciones expuestas a un esteroil lipídico a un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico;

5 v) la exposición de la segunda de dichas fracciones expuestas a un esteroil lipídico a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado de ácido micólico; o el almacenamiento de al menos parte de la segunda de dichas fracciones para su uso posterior, saltándose la etapa de exposición de la segunda de dichas fracciones a un sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;

en el que tras la exposición en las etapas iv) y v) al menos parte de las fracciones expuestas de la muestra se almacenan para su uso posterior.

10 6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho antígeno derivado del ácido micólico es al menos uno seleccionado de entre el grupo de ácido micólico, factor cordal, ácido micólico modificado químicamente, factor cordal modificado químicamente, un derivado sintético del ácido micólico, un derivado sintético del factor cordal; y/o

15 en el que dicho esteroil lipídico está inmovilizado en un sustrato que comprende dicho esteroil lipídico y un compuesto de unión al colesterol de la muestra, tal como pectina, anfotericina B o β-ciclodextrina, o en un sustrato que comprende dicho esteroil lipídico y fosfatidil colina.

20 7. Sistema o dispositivo para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de la tuberculosis activa, que comprende al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico, en el que dicho esteroil lipídico está inmovilizado en un sustrato, en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo, y en el que dicho esteroil lipídico depura de la muestra los anticuerpos anti-colesterol, dispuesto y configurado para la recepción de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa; medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; estando dicho medio conectado corriente arriba o corriente abajo de dicho al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico; un recipiente adicional para la recepción de dicha primera corriente de muestra en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico, y que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un recipiente más adicional para la recepción de la segunda corriente de muestra en una disposición paralela a dicho recipiente adicional y en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico; y que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y un primer sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la primera corriente de muestra desde dicho recipiente adicional y un segundo sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la segunda corriente de muestra desde dicho recipiente más adicional.

25 8. Sistema o dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7, que es un dispositivo portátil para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa que comprende un biosensor (8) que comprende una primera cámara (9) para la recepción de la primera corriente de muestra en conexión con dicho recipiente adicional (6), que comprende un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y una segunda cámara (10) para la recepción de la segunda corriente de muestra en conexión con dicho recipiente más adicional (7) y que comprende el mismo sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico que la primera cámara (9); y/o

40 que comprende adicionalmente una unidad de filtro (3) en conexión con dicho primer tubo (2) y dicho primer recipiente (4) y configurado para separar el plasma de una muestra de sangre completa, preferentemente en el que la unidad de filtro (3) comprende una matriz de filtro.

9. Sistema o dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, que comprende

45 - un extremo de penetración (1) en la piel conectado a un primer tubo (2), que está dispuesto y configurado para la recepción de una muestra de sangre desde el extremo de penetración (1) en la piel y para llevar dicha muestra de sangre lejos del sitio de la piel;

- una unidad de filtro (3) en conexión con dicho primer tubo (2) para la recepción de dicha muestra de sangre y configurada para separar el plasma de dicha muestra de sangre completa;

50 - un primer recipiente (4) para la recepción de dicha muestra, comprendiendo dicho primer recipiente (4) un esteroil lipídico;

- un medio (5) para la división de dicha muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra;

- un segundo recipiente (6) para la recepción de dicha primera corriente de muestra, comprendiendo dicho segundo recipiente un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico;

55 - un tercer recipiente (7) para la recepción de dicha segunda corriente de muestra, comprendiendo dicho tercer recipiente un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; y

- un biosensor (8) que comprende una primera cámara (9) para la recepción de la primera corriente de muestra en conexión con el segundo recipiente (6), que comprende un sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y una segunda cámara (10) para la recepción de la segunda corriente de muestra en conexión con el tercer recipiente (7) y que comprende el mismo sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico que la primera cámara (9).

60 10. Sistema o dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el sustrato de la primera

y segunda cámaras (9, 10) está basado en sílice, preferentemente, en el que dicho biosensor comprende un resonador de anillo de Si.

5 11. Sistema o dispositivo de pretratamiento de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa, que comprende al menos un recipiente que comprende inmovilizado un esteroil lipídico en un sustrato, en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo, y en el que dicho esteroil lipídico depura de la muestra los anticuerpos anti-colesterol, dispuesto y configurado para la recepción de una corriente de muestra de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa; un medio para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; conectado dicho medio corriente arriba o corriente abajo a dicho al menos un recipiente que comprende un esteroil lipídico; un recipiente adicional para la recepción de dicha primera corriente de muestra en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico, y que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico; un recipiente más adicional para la recepción de dicha segunda corriente de muestra en una disposición paralela a dicho recipiente adicional y en conexión corriente abajo con dicho recipiente que comprende un esteroil lipídico; y que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico, y un medio para el almacenamiento o transporte de las muestras tratadas.

20 12. Sistema o dispositivo de pretratamiento de una corriente de muestra derivada de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa, que comprende un medio para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; al menos una primera y segunda columna, configuradas para la recepción de dicha primera y dicha segunda corriente de muestra respectivamente; comprendiendo dicha primera columna un compartimento que comprende un esteroil lipídico inmovilizado en un sustrato, en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo, y en el que dicho esteroil lipídico depura de la muestra los anticuerpos anti-colesterol, y un compartimento adicional que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico; y dicha segunda columna que comprende un compartimento que comprende un esteroil lipídico y un compartimento más adicional que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico; y medios para el almacenamiento o transporte de las muestras tratadas que se han pasado por dichas columnas.

30 13. Sistema o dispositivo para llevar a cabo un procedimiento de detección de un marcador de tuberculosis activa en una muestra derivada de un ser humano o un animal sospechoso de tener tuberculosis activa, que comprende medios para la división de dicha corriente de muestra en al menos una primera y una segunda corriente de muestra; al menos una primera y segunda columna, configuradas para la recepción de dicha primera y dicha segunda corriente de muestra respectivamente; comprendiendo dicha primera columna un compartimento que comprende un esteroil lipídico inmovilizado en un sustrato, en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo, y en el que dicho esteroil lipídico depura de la muestra los anticuerpos anti-colesterol, y un compartimento adicional que comprende un primer sustrato que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico; y dicha segunda columna que comprende un compartimento que comprende un esteroil lipídico y un compartimento más adicional que comprende un segundo sustrato que no lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico corriente abajo de dicho compartimento que comprende un esteroil lipídico y un primer sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la primera corriente de muestra y un segundo sustrato de detección que lleva inmovilizado un antígeno derivado del ácido micólico para la recepción de al menos parte de la segunda corriente de muestra.

45 14. Sistema o dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que dicho esteroil lipídico está inmovilizado en perlas, y dicho primer y segundo sustrato son perlas.

15. Sistema o dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10, 13-14, en el que el primer y segundo sustrato de detección son una membrana microporosa, preferentemente una membrana de nitrocelulosa, y/o en el que el primer y segundo sustrato de detección se forman por puntos separados en la misma membrana.

50 16. Sistema o dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-15, en el que dicho esteroil lipídico está inmovilizado en un sustrato que comprende dicho esteroil lipídico y un compuesto de unión al colesterol en la muestra tal como pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina.

17. Kit para su uso en el diagnóstico de la tuberculosis o el pretratamiento de las muestras para el diagnóstico de tuberculosis que comprende:

- uno o más medios de penetración de la piel;
- uno o más tubos;
- 55 - uno o más recipientes revestidos con un esteroil lipídico en el que dicho esteroil lipídico es colesterol o un derivado del mismo y opcionalmente fosfatidil colina, pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina;
- uno o más recipientes que comprenden un sustrato con y sin un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico;
- uno o más recipientes para el transporte y almacenamiento de muestras y/o al menos una membrana

microporosa con el antígeno derivado del ácido micólico inmovilizado en ella, y opcionalmente anticuerpos secundarios que se unen a la cadena pesada de los anticuerpos contra antígenos derivados del ácido micólico contenidos en una muestra derivada de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa; o uno o más biosensores que comprenden al menos dos cámaras que comprenden un sustrato con un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico; y

5 - opcionalmente un medio para la dilución de la sangre o el plasma y/o una unidad de filtro; o

que comprende:

- uno o más medios de penetración de la piel;

- uno o más tubos;

10 - una o más columnas, que comprenden un compartimento que comprende un sustrato revestido con un esteroil lipídico y opcionalmente fosfatidil colina, pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina; y un compartimento que comprende un sustrato revestido con un antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico debajo de dicho compartimento que comprende un sustrato revestido con un esteroil lipídico;

15 - una o más columnas, que comprenden un compartimento que comprende un sustrato revestido con un esteroil lipídico y opcionalmente fosfatidil colina, pectina, anfotericina B o β -ciclodextrina; y un compartimento que comprende un sustrato revestido sin antígeno inmovilizado derivado del ácido micólico debajo de dicho compartimento que comprende un sustrato revestido con un esteroil lipídico;

- opcionalmente uno o más recipientes para el transporte y almacenamiento de las muestras;

- opcionalmente un medio para la dilución de la sangre o el plasma y/o una unidad de filtro;

20 - opcionalmente al menos una membrana microporosa con un antígeno derivado del ácido micólico inmovilizado en ella;

- y opcionalmente anticuerpos secundarios que se unen a la cadena pesada de los anticuerpos contra los antígenos derivados del ácido micólico contenidos en la muestra derivada de un ser humano o animal sospechoso de tener tuberculosis activa.

25

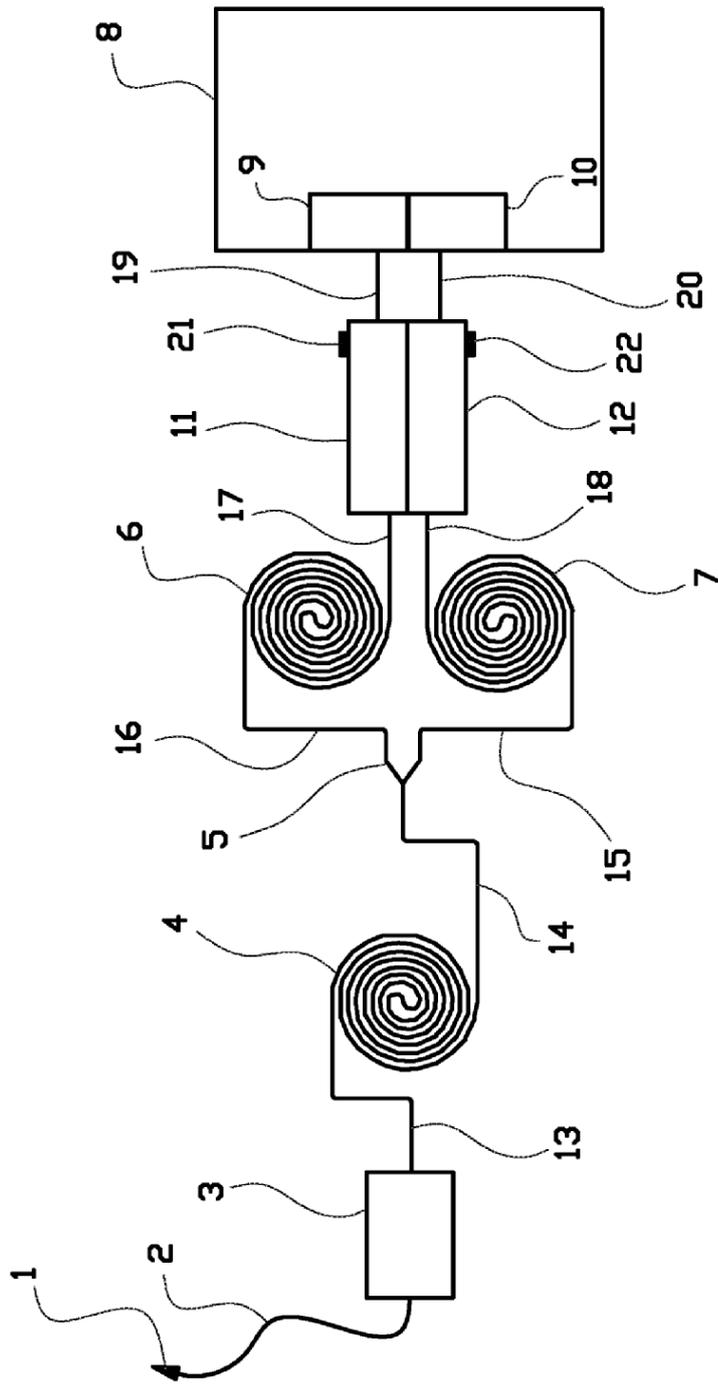


FIG. 1

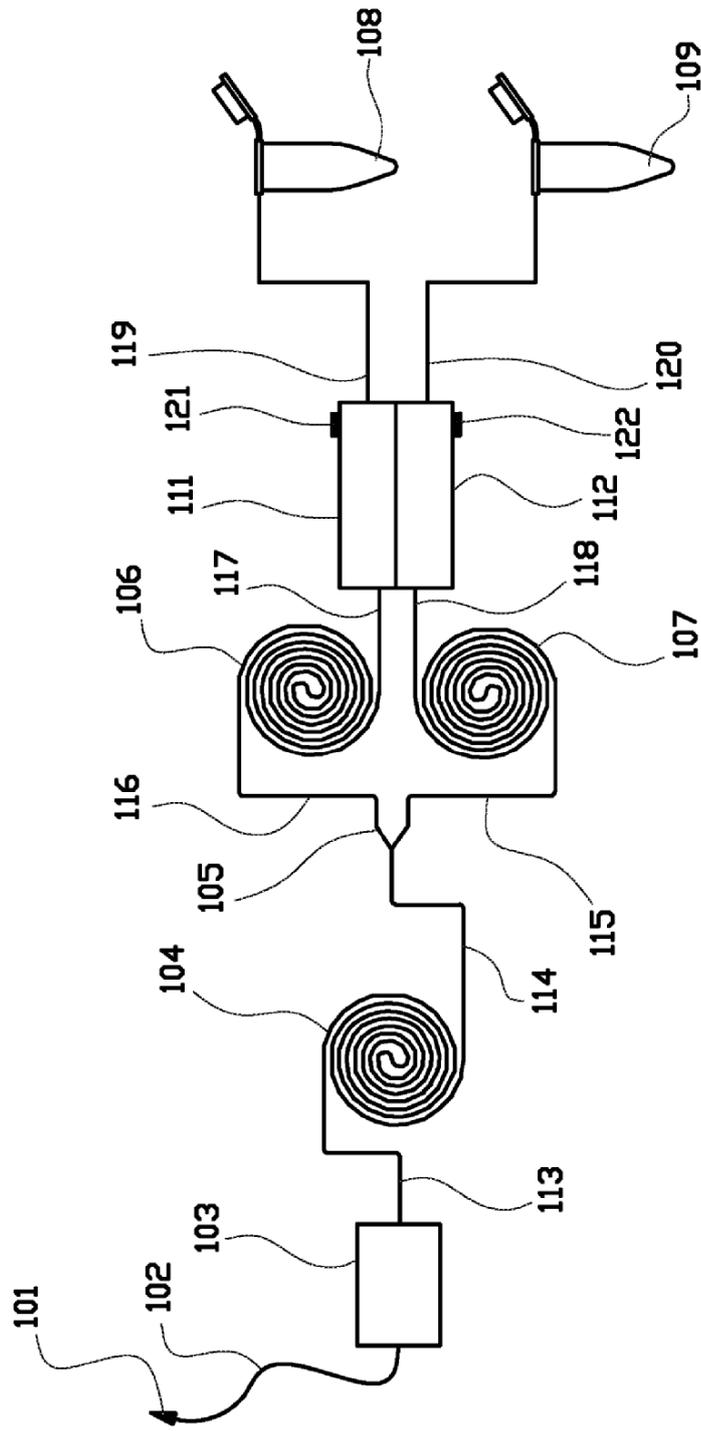


FIG. 2