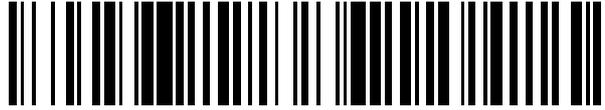


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 616**

51 Int. Cl.:

A61B 5/1455 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2016 PCT/IB2016/000658**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16178083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2016 E 16789365 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3288458**

54 Título: **Método para medir los componentes lagrimales en una muestra lagrimal**

30 Prioridad:

01.05.2015 US 201562156093 P

01.05.2015 US 201562156079 P

01.05.2015 US 201562156072 P

01.05.2015 US 201562156087 P

14.01.2016 US 201662278814 P

14.01.2016 US 201662278805 P

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

20.05.2020

73 Titular/es:

DIAGNOSTEAR, LTD. (100.0%)

**Kiryat Atidim, Bldg. 7, 2nd Floor P.O. Box 58172
6158101 Tel Aviv, IL**

72 Inventor/es:

**SOMMER, AMOS;
FAKTOR, OURIEL y
EILAT, ERAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 761 616 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para medir los componentes lagrimales en una muestra lagrimal

Antecedentes

5 El síndrome del ojo seco es un trastorno de la película lagrimal resultante de una deficiencia lagrimal que causa molestias y daños en la superficie ocular interpalpebral. Las lágrimas son un fluido extracelular que cubre las células epiteliales del epitelio corneal y conjuntival. Las funciones de la película lagrimal incluyen la lubricación de la superficie del ojo y los párpados, la optimización de la función refractiva del segmento anterior y proporción de un medio para eliminar los contaminantes ambientales de la superficie ocular.

10 La película lagrimal normal se compone de tres capas: una capa lipídica externa (aproximadamente 0,1 µm de grosor) producida por las glándulas meibomianas en la placa tarsal, una capa acuosa central (aproximadamente 7-10 µm de grosor) producida tanto por las glándulas lagrimales principal como accesoria, y una capa interna de mucina (aproximadamente 0,2-1,0 µm de grosor) producida por las células caliciformes en la conjuntiva. 4-8 La lista de los componentes lagrimales incluye agua, electrolitos, lípidos y proteínas (TALES como lipocalina, lactoferrina, mucinas y lisozima), así como diversas inmunoglobinas, factores de crecimiento y citoquinas. Cuando la calidad o cantidad de lágrimas se ve comprometida por un desequilibrio o degradación de estos componentes, puede afectar severamente el ojo y causar o exacerbar los síntomas del ojo seco.

20 Versura et al.: "Diagnostic performance of a tear protein panel in early dry eye", Molecular Vision; vol. 19, 6 de junio de 2013, páginas 1247-1257 es un artículo para evaluar el patrón de proteína lagrimal en pacientes con síntomas subjetivos recientes de ojo seco (DE) y con signos clínicos distintivos pobres de DE. Se incluyeron en el estudio 160 pacientes que se sospechaba que padecían DE leve a moderado según el grado de gravedad del Grupo de Trabajo del Ojo Seco (informe DEWS 2007) y 45 voluntarios normales coincidentes. Se realizaron la puntuación de síntomas subjetivos (puntuación del índice de Enfermedad de la Superficie Ocular), ensayo de Schirmer I, tiempo de ruptura de la película lagrimal, tinción de córnea y conjuntiva (puntuación del Instituto Nacional del Ojo); y análisis de proteínas lagrimales. La evaluación estadística de los datos se realizó con ensayos de Mann-Whitney no emparejados y de la t de Student (significancia $p < 0,05$). Las correlaciones entre las variables se evaluaron mediante el uso de los coeficientes de correlación de Pearson (r) o Spearman (ρ). Los umbrales se seleccionaron de las curvas de operación del receptor; se calcularon la sensibilidad, especificidad, relación de probabilidad (LR+) y valores predictivos positivos para cada proteína. La combinación de variables se llevó a cabo mediante análisis monofactorial, que representa la mejor combinación de ensayos para el diagnóstico temprano de DE. Los resultados fueron el contenido total de proteínas (TP) y las siguientes proteínas fueron reconocidas en todas las muestras: lisozima C (LYS-C), lactoferrina (LACTO), lipocalina lagrimal 1 (LIPOC-1), cinc-alfa-2-glicoproteína (ZAG-2), transferrina (TRANSF) y albúmina sérica exudada (ALB). Se demostró una disminución estadísticamente significativa entre los sujetos normales y los pacientes con DE (mg/ml, media±SD) para TP (9,89±2,28 frente a 6,44±2,1), LYS-C (3,06±1,07 frente a 2,15±0,78), LIPOC-1 (1,71±0,52 frente a 0,98±0,5), ZAG-2 (0,43±0,24 frente a 0,25±0,2), TRANSF (0,9±0,6 frente a 0,33±0,3), y LACTO (2,11±0,74 frente a 1,47±0,76), mientras se encontró un incremento para ALB (0,21±0,5 frente a 0,94±1,28). LIPOC-1 y ZAG-2 se correlacionaron fuertemente con el tiempo de ruptura de la película lagrimal. Las proteínas estaban relacionadas con el grado de gravedad de DEWS. Los cambios en cada proteína fueron un mejor predictor de DE temprano que las variables clínicas; TP, LIPOC-1 y ALB exhibieron el rendimiento diagnóstico más alto solas (LR+ 16,7, 12,3, 4,7, respectivamente) o cuando se combinaron en un análisis monofactorial (LR+: 41,8, valor predictivo positivo: 99,9). Los resultados demostraron en las lágrimas de pacientes con DE temprano una reducción significativa en el contenido de proteínas lagrimales en su conjunto, asociada con una disminución de proteínas con funciones antibacterianas y protectoras. También se mostró una disminución de las proteínas con propiedades de unión a lípidos y un aumento de las proteínas relacionadas con la inflamación. Se descubrió que los cambios en la abundancia de un panel de proteínas lagrimales con funciones divergentes diagnostican mejor el DE temprano que los ensayos clínicos convencionales.

Resumen

Según las realizaciones de la invención, se proporcionan métodos como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo obtenida usando un ensayo de lactoferrina.

50 La Figura 2 muestra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo obtenida usando un ensayo de lactoferrina con concentración de analito.

La Figura 3 muestra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo obtenida usando un ensayo de albúmina sérica humano con concentración de analito.

55 La Figura 4 muestra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo obtenida usando un ensayo de lisozima con concentración de analito.

La Figura 5 muestra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo obtenida usando un ensayo de mucina con concentración de analito.

La Figura 6 muestra un dispositivo.

Descripción detallada

5 Además, tal y como se usa en la presente memoria, el término "o" es un operador inclusivo "o", y es equivalente al término "y/o", a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. El término "basado en" no es exclusivo y permite basarse en factores adicionales no descritos, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Además, a lo largo de la memoria descriptiva, el significado de "un", "una" y "el/ella" incluye referencias plurales. El significado de "en" incluye "en" y "sobre".

10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "una enfermedad del ojo seco" se refiere a un trastorno de la película lagrimal resultante de una deficiencia lagrimal que causa malestar y daño a la superficie ocular interpalpebral. En algunas realizaciones del método de la presente invención, la enfermedad del ojo seco puede estar causada por, pero no limitada a, la exacerbación por condiciones ambientales, por elecciones de estilo de vida o por medicaciones.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "volumen efectivo", cuando se usa para describir las lágrimas recogidas en algunos métodos de las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria, se refiere a un volumen lo suficientemente grande como para proporcionar un resultado definitivo cuando se somete a un ensayo químico o físico particular. Por lo tanto, el "volumen efectivo" dependerá del ensayo particular que se realice.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "lisozima" se refiere a una proteína sintetizada y secretada por los ácinos de la glándula lagrimal. La cantidad de lisozima presente en las lágrimas normales varía de 0,6-2,6 mg/ml, donde actúa como un antibacteriano al degradar los componentes de la pared celular de las bacterias en la película lagrimal.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ojo seco leve" se refiere a síntomas o signos transitorios de la enfermedad que no requieren tratamiento, según lo diagnosticado por un paciente y/o un profesional médico (p. ej., pero no limitado a, un médico, una enfermera, etc.) Para que el ojo seco se considere moderado, los pacientes deben experimentar signos o síntomas que respondan a medidas terapéuticas simples (p. ej., pero no limitado a, la aplicación de gotas para el o los ojos secos).

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "medición de intensidad semicuantitativa" se refiere a un resultado obtenido de un ensayo, donde el ensayo incluye un tiempo de ejecución fijo y el uso de una(s) tira(s) de ensayo configuradas para recibir una lágrima que contiene al menos un constituyente lagrimal (p. ej., lisozima) por un profesional médico, y donde un profesional médico compara la intensidad de línea de la tira de ensayo (es decir, una tira de análisis lagrimal) con una imagen impresa control que contiene un panel de intensidades de línea (p. ej., como se muestra en las Figuras 1 y 2) (referido en la presente memoria como "un panel de escala") que contiene una pluralidad de intensidades de línea para determinar si el resultado de intensidad de la tira de ensayo indica que un sujeto tiene una enfermedad del ojo seco. Esta medición de intensidad semicuantitativa se puede usar para comparar y correlacionar con otros ensayos, tales como el ensayo de Schirmer, TFBUT, OSDI, tinción corneal o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos de la descripción, el panel de escala es una imagen impresa de una pluralidad de intensidades de línea de color.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "lágrima(s)" se refiere a un fluido extracelular que cubre las células epiteliales superficiales del epitelio corneal y conjuntival, donde la película lagrimal representa la última línea de defensa para la superficie ocular. Las funciones principales de la película lagrimal son lubricar la superficie y los párpados, optimizar la función refractiva del segmento anterior y proporcionar un medio para eliminar los contaminantes ambientales de la superficie ocular. La película lagrimal normal se compone de tres capas: una capa lipídica externa (aproximadamente 0,1 µm de grosor) producida por las glándulas meibomianas en la placa tarsal, una capa acuosa central (aproximadamente 7-10 µm de grosor) producida por las glándulas lagrimales tanto principal como accesoria y una capa interna de mucina (aproximadamente 0,2-1,0 µm de grosor) producida por las células caliciformes en la conjuntiva.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "componentes lagrimales" se refiere a las moléculas en las lágrimas e incluye, pero no está limitado a, agua, electrolitos, moléculas antimicrobianas, inmunoglobulinas, mucinas, lípidos, factores de crecimiento o cualquier combinación de los mismos. Cuando la calidad o cantidad de las lágrimas se ve comprometida por un desequilibrio o degradación de cualquiera de estos componentes, el resultado puede ser una causa o exacerbación de los síntomas del ojo seco.

La siguiente es una lista de términos y abreviaturas adjuntas de los términos usados en la presente memoria:

Abreviatura	Término
AE	evento adverso
BCA	ácido bicinconínic, reactivo para la determinación de proteínas

ES 2 761 616 T3

Abreviatura	Término
CAE	ambiente adverso controlado
DE	ojo seco
ETDRS	Estudio de tratamiento temprano de la retinopatía diabética
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
g	Gramo
IOP	presión intraocular
IRB	junta de revisión institucional/independiente
IU	unidad internacional
IV	Intravenoso
kg	Kilogramo
logMAR	logaritmo del ángulo mínimo de resolución
MedDRA	Diccionario médico para actividades reguladoras
mg	Miligramo
µg	Microgramo
ml	Mililitro
µl	microlitro
mm	Milímetro
µm	Micrómetro
OSDI	Índice de enfermedad de la superficie ocular
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
TFBUT	Tiempo de ruptura de la película lagrimal
de Schirmer	Ensayo de Schirmer

En algunos aspectos de la descripción, hay un método, en donde el método clasifica a un sujeto como que padece ojo seco, consistiendo el método en:

- a. obtener datos demográficos, que consisten en la edad y el género del sujeto;
- 5 b. obtener una muestra de lágrima del paciente y determinar el nivel de al menos un constituyente lagrimal seleccionado del grupo que consiste en: albúmina sérica humana, lactoferrina, lisozima y mucina;
- c. a partir de la cantidad determinada, asignando una puntuación para el nivel del al menos un constituyente lagrimal y
- 10 d. a partir de la puntuación para el al menos un constituyente lagrimal, calcular una puntuación de probabilidad de corte, en donde que el sujeto tiene ojo seco, si la puntuación de probabilidad de corte calculada es del 50 % al 60 %.

15 En algunos aspectos de la descripción, la determinación del nivel del al menos un constituyente lagrimal se realiza usando una reacción inmunoquímica, configurada para producir un color, en donde la intensidad del color es proporcional a la cantidad del al menos uno constituyente lagrimal en la muestra de lágrima, y en donde la puntuación se asigna de acuerdo con la intensidad del color.

En algunos aspectos de la descripción, la puntuación se selecciona del grupo que consiste en: 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 y 2,0.

En algunos aspectos de la descripción, hay un método, en donde el método clasifica a un sujeto como que padece ojo seco, consistiendo el método en:

- 20 a. obtener datos demográficos, que consisten en la edad y el género del sujeto;
- b. obtener una muestra de lágrima del paciente y determinar el nivel de albúmina sérica humana;
- c. a partir del nivel determinado de albúmina sérica humana, asignar una puntuación para la cantidad determinada de albúmina sérica humana; y

ES 2 761 616 T3

- d. a partir de la puntuación asignada, calcular una puntuación de probabilidad de corte, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\exp(-0,6491 - 1,1142 * \text{Albúmina})}{1 + \exp(-0,6491 - 1,1142 * \text{Albúmina})}$$

en donde el sujeto tiene ojo seco, si la puntuación de probabilidad de corte calculada es del 50 % al 60 %.

- 5 En algunos aspectos de la descripción, el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 50 %, y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 77 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 30 % del tiempo.

- 10 En algunos aspectos de la descripción, el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 60 %, y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 68 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 63 % del tiempo.

En algunos aspectos de la descripción, la determinación del nivel de la albúmina sérica humana se realiza usando una reacción inmunoquímica, configurada para producir un color, en donde la intensidad del color es proporcional a la cantidad de albúmina sérica humana en la muestra de lágrima, y en donde la puntuación se asigna de acuerdo con la intensidad del color.

- 15 En algunos aspectos de la descripción, la puntuación se selecciona del grupo que consiste en: 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 y 2,0.

En algunos aspectos de la descripción, hay un método, en donde el método clasifica a un sujeto como que padece ojo seco, consistiendo el método en:

- a. obtener datos demográficos, que consisten en la edad y el género del sujeto;
- 20 b. obtener una muestra de lágrima del paciente y determinar el nivel de albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima;
- c. a partir del nivel determinado de albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima, asignar una puntuación para la cantidad determinada de albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima; y
- 25 d. a partir de la puntuación asignada, calcular una puntuación de probabilidad de corte, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\exp(-5,7198 - 3,9059 * \text{Albúmina} - 0,7375 * \text{Lisozima} - 2,7929 * \text{Lactoferrina} + 0,1507 * \text{Edad (años)} + 1,2206 * (-1 \text{ si es hombre}) + 7,1682 * \text{Albúmina} * \text{Lactoferrina} + 4,4090 * \text{Albúmina} * \text{Lisozima} - 10,7566 * \text{Lisozima} * \text{Lactoferrina})}{1 + \exp(-5,7198 - 3,9059 * \text{Albúmina} - 0,7375 * \text{Lisozima} - 2,7929 * \text{Lactoferrina} + 0,1507 * \text{Edad (años)} + 1,2206 * (-1 \text{ si es hombre}) + 7,1682 * \text{Albúmina} * \text{Lactoferrina} + 4,4090 * \text{Albúmina} * \text{Lisozima} - 10,7566 * \text{Lisozima} * \text{Lactoferrina})}$$

en donde el sujeto tiene ojo seco, si la puntuación de probabilidad de corte calculada es del 50 % al 60 %.

- 30 En algunos aspectos de la descripción, el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 50 % y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 88 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 76 % del tiempo.

En algunos aspectos de la descripción, el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 55 % y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 84 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 80 % del tiempo.

- 35 En algunos aspectos de la descripción, el método tiene una probabilidad de corte del 60 % y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 81 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 86 % del tiempo.

En algunos aspectos de la descripción, la puntuación se selecciona del grupo que consiste en: 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 y 2,0.

- 40 En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima está entre 1 y 25 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 1 microlitro. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 2 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 4 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 6 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 8 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 10 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 12 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el
- 45

volumen de la muestra de lágrima es de 14 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 16 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 18 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 20 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 21 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 22 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 23 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 24 microlitros. En algunos aspectos de la descripción, el volumen de la muestra de lágrima es de 25 microlitros.

Medición de constituyentes en muestras de fluido lagrimal

10 En algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de al menos un constituyente lagrimal en una muestra lagrimal, seleccionado del grupo que consiste en lisozima, lactoferrina, mucina, albúmina sérica humana y cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos de la descripción, el método es una prueba de múltiples ensayos.

15 En algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de albúmina sérica humana en una muestra lagrimal.

En algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de albúmina sérica humana y lactoferrina en una muestra lagrimal.

En algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima en una muestra lagrimal.

20 Medición de la albúmina sérica humana (HSA) en muestras de fluido lagrimal: en algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de albúmina sérica humana (HSA) en una muestra lagrimal, que comprende: recoger la muestra lagrimal que contiene la cantidad de HSA de un sujeto, donde la cantidad de HSA de la muestra lagrimal se usa para generar una medición de intensidad semicuantitativa de HSA al: recoger la muestra lagrimal que contiene la cantidad de HSA del sujeto; poner en contacto la muestra lagrimal que contiene la cantidad de HSA del sujeto con una tira de análisis lagrimal, donde la tira de análisis lagrimal contiene 0,4 µg de al menos un anticuerpo anti-HSA (p. ej., el clon monoclonal anti HSA M12619HS3, Fitzgerald Industries International, 30 Sudbury Road, Suite 1A North Acton, MA 01720 EE. UU.), se conjuga con oro coloidal en una relación de 0,4 µg/ml de anticuerpo a OD 1 de coloide a 526 nm, donde la cantidad del al menos un anticuerpo anti-HSA (p. ej., clon monoclonal anti HSA M12619HS1, Fitzgerald Industries International, 30 Sudbury Road, Suite 1A North Acton, MA 01720 EE. UU.), se dispensa en papel de nitrocelulosa a una concentración de 1 mg/ml para incubar la cantidad de HSA del sujeto en la tira de análisis lagrimal para dar como resultado una intensidad de línea de HSA; y utilizar la intensidad de línea de HSA para determinar la medición de intensidad semicuantitativa de HSA; donde la medición de intensidad semicuantitativa de HSA se selecciona del grupo que consiste en: 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 y 2,0.

25

30

35 La Figura 3 ilustra la correlación de la intensidad de línea de ensayo obtenida usando un ensayo de albúmina sérica humana según algunos aspectos de la descripción con concentración de analito. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de línea de ensayo reducida se correlaciona con un ensayo existente para ojo seco (p. ej., ensayo de Schirmer, tinción corneal, OSDI, etc.).

Con referencia a la Figura 3, en algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,1 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 0 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,25 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 0,1 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la divulgación. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,5 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 0,5 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,75 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 0,75 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,0 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 1 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,25 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 1,1 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,5 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 1,2 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,75 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 6 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 2,0 se correlaciona con una concentración de albúmina sérica humana de 10 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción.

40

45

50

55

En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de albúmina sérica humana en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 0,1

$\mu\text{g/ml}$ se correlaciona con un menor resultado detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

5 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de albúmina sérica humana en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ se correlaciona con un mayor resultado detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

10 Medición de lactoferrina en muestras de fluido lagrimal: en algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de lactoferrina en una muestra lagrimal, que comprende: recoger la muestra lagrimal que contiene la cantidad de lactoferrina de un sujeto, y donde la cantidad de lactoferrina de la muestra lagrimal se usa para generar una medición de intensidad semicuantitativa de lactoferrina al: recoger la muestra lagrimal que contiene la cantidad de lactoferrina del sujeto; poner en contacto la muestra lagrimal que contiene la cantidad de lactoferrina del sujeto con una tira de análisis lagrimal, donde la tira de análisis lagrimal está unida a una cantidad de aglutinina de pisum stivum (PSA) unida a biotina y una cantidad de aglutinina de lens culinaris (LCA) (donde al menos la PSA está unido a la nitrocelulosa de la tira de análisis lagrimal), donde la cantidad de PSA unida a la biotina se conjuga con oro coloidal en una relación de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a la biotina por 1 densidad óptica (DO) por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina, incubar la cantidad de lactoferrina del sujeto en la tira de análisis lagrimal para dar como resultado una intensidad de línea de lactoferrina; y utilizar la intensidad de línea de lactoferrina para determinar la medición de intensidad semicuantitativa de lactoferrina; donde la medición de intensidad semicuantitativa de lactoferrina se selecciona del grupo que consiste en: 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 y 2,0.

20 En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 3 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 3,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 4 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 4,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 5,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 6 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 6,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 7 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 8 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 8,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 9 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 9,5 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 10 $\mu\text{g/ml}$ de PSA unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina.

La Figura 2 ilustra la correlación de la intensidad de línea de ensayo obtenida usando un ensayo de lactoferrina según algunos aspectos de la descripción con concentración de analito. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de línea de ensayo reducida se correlaciona con un ensayo existente para ojo seco (p. ej., ensayo de Schirmer, tinción corneal, OSDI, etc.).

45 Con referencia a la Figura 2, en algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,1 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 1 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,25 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 4 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,5 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,75 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 25 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,0 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 50 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,25 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 75 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,5 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 100 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,75 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 150 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 2,0 se correlaciona con una concentración de lactoferrina de 200 $\mu\text{g/ml}$ observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción.

En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de lactoferrina en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 1 a 4 µg/ml se correlaciona con un resultado más bajo detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

- 5 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de lactoferrina en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 1 a 4 µg/ml se correlaciona con un resultado más alto detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

- 10 Medición de lisozima en muestras de fluido lagrimal: en algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de lisozima en una muestra lagrimal, que comprende: recoger la muestra lagrimal que contiene la cantidad de lisozima de un sujeto, donde la cantidad de lisozima de la muestra lagrimal se usa para generar una medición de intensidad semicuantitativa de lisozima al: diluir la muestra lagrimal con un tampón de dilución; poner en contacto la muestra lagrimal diluida que contiene la cantidad de lisozima del sujeto con una tira de análisis lagrimal, en donde la tira de análisis lagrimal contiene una cantidad de un primer anticuerpo (tal como, por ejemplo, pero no limitado a, un anticuerpo anti-lisozima de oveja o conejo) y una cantidad de un segundo anticuerpo (tal como, por ejemplo, pero no limitado a, un anticuerpo anti-lisozima de conejo), en donde la cantidad del primer anticuerpo se conjuga con oro coloidal en una relación de 2,5 µg/ml a 10 µg/ml por 1 densidad óptica (DO) por mililitro de oro coloidal, y 1,5 µg/ml del segundo anticuerpo se incluye como línea de captura en la tira de análisis lagrimal, incubar la cantidad de lisozima del sujeto en la tira de análisis lagrimal para dar como resultado una intensidad de línea de lisozima; y utilizar la intensidad de línea de lisozima para determinar la medición de intensidad semicuantitativa de lisozima; en donde la medición de la intensidad semicuantitativa de lisozima se selecciona del grupo que consiste en: 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 y 2,0.

- 25 En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 2,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 3 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 3,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 4 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 4,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 5,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 6 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 6,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 7 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 7,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 8 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 8,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 9 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 9,5 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la proporción es de 10 µg/ml del primer anticuerpo por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina.

- 45 La Figura 4 ilustra la correlación de la intensidad de línea de ensayo obtenida usando un ensayo de lisozima según algunos aspectos de la descripción con concentración de analito. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de línea de ensayo reducida se correlaciona con un ensayo existente para ojo seco (p. ej., ensayo de Schirmer, tinción corneal, OSDI, etc.).

- 50 Con referencia a la Figura 4, en algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,1 se correlaciona con una concentración de lisozima de 0 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,25 se correlaciona con una concentración de lisozima de 1 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,5 se correlaciona con una concentración de lisozima de 3 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,75 se correlaciona con una concentración de lisozima de 12 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,0 se correlaciona con una concentración de lisozima de 25 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,25 se correlaciona con una concentración de lisozima de 40 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,5 se correlaciona con una concentración de lisozima de 70 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,75 se correlaciona con una concentración de lisozima de 100 µg/ml observada en un ensayo de

prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 2,0 se correlaciona con una concentración de lisozima de 150 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción.

5 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de lisozima en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 1 µg/ml se correlaciona con un resultado más bajo detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

10 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de lisozima en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 1 µg/ml se correlaciona con un resultado más alto detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

15 Medición de mucina en muestras de fluido lagrimal: en algunos aspectos de la descripción, hay un método para cuantificar una cantidad de mucina en una muestra lagrimal, que comprende: recoger la muestra lagrimal que contiene la cantidad de mucina de un sujeto, y donde la cantidad de mucina de la muestra lagrimal se usa para generar una medición de intensidad semicuantitativa de la mucina al: recoger la muestra lagrimal que contiene la cantidad de mucina del sujeto; poner en contacto la muestra lagrimal que contiene la cantidad de mucina del sujeto con una tira de análisis lagrimal, donde la tira de análisis lagrimal está unida a una cantidad de jacalina unida a biotina y una cantidad de aglutinina de germen de trigo (WGA), en donde la cantidad de jacalina unida a biotina se conjuga con oro coloidal en una relación de 2,5 µg/ml a 10 µg/ml por 1 densidad óptica (DO) por mililitro de oro coloidal, incubar la cantidad de mucina del sujeto en la tira de análisis lagrimal para dar como resultado una línea de intensidad de mucina; y utilizar la intensidad de línea de mucina para determinar la medición de intensidad semicuantitativa de mucina; en donde la medición de intensidad semicuantitativa de mucina se selecciona del grupo que consiste en: 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 y 2,0.

25 En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 2,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 3 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 3,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 4 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 4,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 5,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 6 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 6,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 7 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 7,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 8 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 8,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 9 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 9,5 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina. En algunos aspectos de la descripción, la relación es de 10 µg/ml de jacalina unida a biotina por 1 DO por mililitro de oro coloidal unido a estreptavidina.

La Figura 5 ilustra la correlación de la intensidad de línea de ensayo obtenida usando un ensayo de mucina según algunos aspectos de la descripción con la concentración de analito. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de línea de ensayo reducida se correlaciona con un ensayo existente para ojo seco (p. ej., ensayo de Schirmer, tinción corneal, OSDI, etc.).

50 Con referencia a la Figura 5, en algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,1 se correlaciona con una concentración de mucina de 0 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,25 se correlaciona con una concentración de mucina de 0,1 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,5 se correlaciona con una concentración de mucina de 0,5 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 0,75 se correlaciona con una concentración de mucina de 1 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,0 se correlaciona con una concentración de mucina de 3 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,25 se correlaciona con una concentración de mucina de 6 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,5 se correlaciona con una concentración de mucina de 12 µg/ml observada en un

5 ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 1,75 se correlaciona con una concentración de mucina de 25 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de 2,0 se correlaciona con una concentración de mucina de 50 µg/ml observada en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción.

En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de mucina en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 1 µg/ml se correlaciona con un resultado más bajo detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

10 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de mucina en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 1 µg/ml se correlaciona con un resultado más alto detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, ODSI y TFBUT.

Dispositivos

15 En algunos aspectos de la descripción, hay un dispositivo para determinar el nivel de al menos un constituyente lagrimal seleccionado del grupo que consiste en: albúmina sérica humana, lactoferrina, lisozima y mucina, comprendiendo el dispositivo:

a. una tira reactiva configurada para recibir una muestra lagrimal del paciente; y

20 b. una almohadilla de reactivo, que contiene reactivos específicos para la albúmina sérica humana, que, al entrar en contacto con la muestra lagrimal, experimenta una reacción configurada para producir un color, en donde la intensidad del color es proporcional a la cantidad de albúmina sérica humana en la muestra lagrimal, y en donde la tira reactiva está configurada para suministrar la muestra lagrimal a la almohadilla de reactivo.

25 En algunos aspectos de la descripción, hay un dispositivo para determinar el nivel de al menos un constituyente lagrimal seleccionado del grupo que consiste en: albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima, comprendiendo el dispositivo:

a. una tira reactiva configurada para recibir una muestra lagrimal del paciente; y

30 b. una pluralidad de almohadillas de reactivos, en donde una primera almohadilla de reactivo individual contiene reactivos específicos para la albúmina sérica humana, una segunda almohadilla de reactivo contiene reactivos específicos para la lisozima, y una tercera almohadilla de reactivo contiene reactivos específicos para la lactoferrina, en donde los reactivos en la primera, segunda y tercera almohadilla de reactivo, al entrar en contacto con la muestra lagrimal, experimentan una reacción configurada para producir un color, en donde la intensidad del color es proporcional a la cantidad de albúmina sérica humana, lisozima y lactoferrina presente en la muestra lagrimal, y en donde el la tira reactiva está configurada para suministrar la muestra lagrimal a la pluralidad de almohadillas de reactivos.

35 En algunos aspectos de la descripción, la reacción configurada para producir un color es una reacción inmunoquímica. En algunos aspectos de la descripción, la reacción configurada para producir un color es una reacción de unión.

40 La Figura 6 muestra una realización ejemplar no limitativa de un dispositivo según algunos aspectos de la descripción. El dispositivo comprende una o más almohadillas que contienen reactivos químicos o biológicos que, al entrar en contacto con las lágrimas, experimentan un reconocimiento inmunoquímico con el analito ensayado y la migración del complejo a una zona definida. Como resultado de lo cual, se observa una línea de color. El diagnóstico puede hacerse después de un tiempo predefinido, p. ej., después de la compleción de la reacción inmunoquímica. El diagnóstico se basa en la comparación de la intensidad de color de la línea observada en la zona de reacción del dispositivo con una intensidad de línea de color de la imagen impresa de referencia. La imagen impresa de las intensidades de línea de color en donde cada intensidad de color representa una o más características para diagnosticar DES. Dichas características pueden ser, pero no están limitadas a, (a) la concentración de al menos una sustancia cuya concentración se sabe que se correlaciona con DES (un ejemplo no limitativo incluye lisozima), la concentración de al menos un nivel de proteína predefinido y electrolitos (tal como sodio, potasio, etc.) (b) osmolaridad, (c) viscosidad y tensión superficial y (d) pH.

50 En algunos aspectos de la descripción del método de la presente invención, el dispositivo también se puede usar para recoger una cantidad de fluido lagrimal suficiente para realizar un diagnóstico médico basado en las características relevantes de las lágrimas. Por lo tanto, el dispositivo puede proporcionar diagnósticos cualitativos, cuantitativos (p. ej., pero no limitados a, el uso de un lector de tiras), semicuantitativos y multifactoriales. En algunos aspectos de la descripción, el dispositivo puede proporcionar así un diagnóstico semicuantitativo.

55 En algunos aspectos de la descripción, el método incluye proporcionar dos lectinas, p. ej., aglutinina de Pisum stivum ("PSA") y aglutinina de Lens culinaris ("LCA") [ambas fabricadas por Medicago AB en: Danmark Berga 13, SE-755 98

Uppsala, Suecia o por VECTOR LABORATORIES, INC: 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, EE. UU.], donde PSA se conjuga con partículas de oro. En algunos aspectos de la descripción, la biotina se une a PSA lo que genera biotina-PSA, y la biotina-PSA se une al conjugado estreptavidina-oro. En algunos aspectos de la descripción, las lectinas se colocan en una tira reactiva. En algunos aspectos de la descripción, al menos una lectina se conjuga con partículas de oro ("marcado con inmuno-oro"). En algunos aspectos de la descripción, las partículas de oro son partículas de oro coloidal. Las partículas de oro coloidal pueden variar de 20-125 nm, 50-125 nm, 100-125 nm, 20-100 nm, 20-50 nm, 20-40 nm, 20-60 nm, 40-60 nm o 50-100 nm.

En algunos aspectos de la descripción, el método de la presente invención incluye proporcionar un anticuerpo de lisozima (anti-lisozima), donde el anti-lisozima está conjugado. En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-lisozima se coloca en una tira reactiva. En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-lisozima se obtiene de una oveja (es decir, anti-lisozima de oveja y/o anti-lisozima de conejo; donde el anti-lisozima de oveja puede ser suministrado por Seramun GmbH [Spreehagener Str. Heideseen 115754, ALEMANIA] o anti-lisozima de conejo suministrada por Nordic MUBio [Rangeerweg 5A 6114 BC Susteren Países Bajos]). En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-lisozima se conjuga con partículas de oro ("marcado con inmuno-oro"). En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-oveja se conjuga con partículas de oro (4 µg de anticuerpos a 1 ml de partículas de oro de DO 1 de 40 nm). En algunos aspectos de la descripción, las partículas de oro son partículas de oro coloidal. Las partículas de oro coloidal pueden variar de 20-125 nm, 50-125 nm, 100-125 nm, 20-100 nm, 20-50 nm, 50-100 nm, 20-60 nm, 40-60 nm o 20-40 nm.

En algunos aspectos de la descripción, el método de la presente invención incluye proporcionar dos lectinas, p. ej., aglutinina de pisum stivum ("PSA") y aglutinina de lens culinaris ("LCA"), donde PSA se conjuga con partículas de oro. En algunos aspectos de la descripción, la biotina se une a PSA lo que genera biotina-PSA, y la biotina-PSA se une al conjugado estreptavidina-oro. En algunos aspectos de la descripción, las lectinas se colocan en una tira reactiva. En algunos aspectos de la descripción, al menos una lectina se conjuga con partículas de oro ("marcado con inmuno-oro"). En algunos aspectos de la descripción, las partículas de oro son partículas de oro coloidal. Las partículas de oro coloidal pueden variar de 20-125 nm, 50-125 nm, 100-125 nm, 20-100 nm, 20-50 nm, 20-60 nm, 20-40 nm, 40-60 nm o 50-100 nm.

En algunos aspectos de la descripción, la tira reactiva contiene nitrocelulosa (p. ej., pero no limitado a, FF120 de Whatman o el CNPH-N-SS60 de Advanced Microdevices PVT).

En algunos aspectos de la descripción, la tira reactiva incluye anticuerpos anti-lisozima de oveja libres [es decir, no conjugados], donde estos anticuerpos libres pueden controlar la sensibilidad del ensayo.

En algunos aspectos de la descripción, el método incluye una etapa comparativa donde la medición de la intensidad semicuantitativa de la lisozima se correlaciona con los resultados del método de Schirmer. Según el método de Schirmer, se usa una tira de papel para medir la cantidad de lágrimas producidas durante un período de cinco minutos. La tira se coloca en la unión de los tercios medio y lateral del párpado inferior, entre el globo ocular y el párpado. El ensayo se realiza bajo luz ambiental. Se le indica al paciente que mire hacia adelante y que parpadee normalmente durante el transcurso del ensayo. La humectación de más 10 mm del papel en 5 minutos se toma como una indicación de que el ojo produce una cantidad normal de lágrimas. La especificidad (es decir, la capacidad del ensayo para identificar individuos normales) del método de Schirmer suele ser de alrededor del 90 %. El ensayo de Schirmer proporciona una verdadera identificación de individuos sospechosos de DED - a una tasa del 20 % del total de la población sospechosa de DED. El ensayo de Schirmer proporciona resultados positivos verdaderos cuando la humectación es inferior a 5 mm y resultados negativos verdaderos cuando el nivel de humectación es superior a 10 mm y puede proporcionar resultados falsos positivos cuando el nivel de humectación está entre 5 mm y 10 mm. Cuando el nivel de humectación está entre 5 mm y 10 mm, se sospecha que el paciente tiene DES, pero los resultados no pueden considerarse concluyentes.

En algunos aspectos de la descripción, el método incluye una etapa comparativa donde la medición de la intensidad semicuantitativa de la lactoferrina se correlaciona con los resultados del método de Schirmer. Según el método de Schirmer, se usa una tira de papel para medir la cantidad de lágrimas producidas durante un período de cinco minutos. La tira se coloca en la unión de los tercios medio y lateral del párpado inferior, entre el globo ocular y el párpado. La prueba se realiza bajo luz ambiental. Se le indica al paciente que mire hacia adelante y que parpadee normalmente durante el transcurso del ensayo. La humectación de más 10 mm del papel en 5 minutos se toma como una indicación de que el ojo produce una cantidad normal de lágrimas. La especificidad (es decir, la capacidad del ensayo para identificar individuos normales) del método de Schirmer suele ser de alrededor del 90 %. El ensayo de Schirmer proporciona una verdadera identificación de individuos sospechosos de DED a una tasa del 20 % del total de la población sospechosa de DED. El ensayo de Schirmer proporciona resultados positivos verdaderos cuando la humectación es inferior a 5 mm y resultados negativos verdaderos cuando el nivel de humectación es superior a 10 mm y puede proporcionar resultados falsos positivos cuando el nivel de humectación está entre 5 mm y 10 mm. Cuando el nivel de humectación está entre 5 mm y 10 mm, se sospecha que el paciente tiene DES, pero los resultados no pueden considerarse concluyentes.

En algunos aspectos de la descripción, el método incluye una etapa comparativa donde la medición de la intensidad semicuantitativa de la mucina se correlaciona con los resultados del método de Schirmer. Según el método de

Schirmer, se usa una tira de papel para medir la cantidad de lágrimas producidas durante un período de cinco minutos. La tira se coloca en la unión de los tercios medio y lateral del párpado inferior, entre el globo ocular y el párpado. La prueba se realiza bajo luz ambiental. Se le indica al paciente que mire hacia adelante y que parpadee normalmente durante el transcurso del ensayo. La humectación de más 10 mm del papel en 5 minutos se toma como una indicación de que el ojo produce una cantidad normal de lágrimas. La especificidad (es decir, la capacidad del ensayo para identificar individuos normales) del método de Schirmer suele ser de alrededor del 90 %. El ensayo de Schirmer proporciona resultados positivos verdaderos cuando la humectación es inferior a 5 mm y resultados negativos verdaderos cuando el nivel de humectación es superior a 10 mm y puede proporcionar resultados falsos positivos cuando el nivel de humectación está entre 5 mm y 10 mm. Cuando el nivel de humectación está entre 5 mm y 10 mm, se sospecha que el paciente tiene DES, pero los resultados no pueden considerarse concluyentes.

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunos aspectos de la descripción de la invención de una manera no limitativa.

Ejemplos

Ejemplo 1: medición de lactoferrina en muestras lagrimales

Se examinaron los niveles de un constituyente lagrimal prominente en sujetos sanos y en sujetos que cumplían uno o más criterios de ojo seco leve a moderado. Los siguientes experimentos ilustran una comparación entre los ensayos de referencia para la evaluación del ojo seco con una medida cuantitativa de un constituyente lagrimal. Los ejemplos de los ensayos usados para medir cuantitativamente al menos un constituyente lagrimal son la tinción corneal, los ensayos de Schirmer, TFBUT y la evaluación de los síntomas proporcionados incluyendo el cuestionario OSDI y la puntuación de molestia ocular Ora-Calibra™. El OSDI es una evaluación de 12 preguntas que se ha convertido en un estándar para la sintomatología del ojo seco. Las evaluaciones de molestias Ora-Calibra™ también proporcionan una medición de la sintomatología al permitir que un paciente responda preguntas, donde el número de preguntas se reduce en comparación con el OSDI. Se recogieron muestras lagrimales usando tubos capilares y luego se analizaron para el constituyente lagrimal. El constituyente lagrimal medido fue lactoferrina.

Ensayo del constituyente lagrimal y metodología de la medición

Se usaron tiras reactivas rápidas (tiras de análisis lagrimal) y reactivos para medir los niveles de lactoferrina usando una técnica semicuantitativa; donde la técnica semicuantitativa siguió un tiempo de ejecución fijo para cada tipo de ensayo, las tiras se escanearon con el modelo de escáner HP scanjet 200. La figura escaneada se optimizó usando la función Aclarar/Oscurecer: Destacados - (-) 50; Sombras - (-) 69; Medios tonos - (-) 50; Gamma-1,7 seguido por el registro de la intensidad de la señal (que se muestra en la Figura 2). La determinación del constituyente lagrimal se realizó utilizando una estimación semicuantitativa de las líneas de ensayo de intensidad en comparación con la intensidad de una serie de líneas control.

Diseño experimental

Población de sujetos: los sujetos para el estudio incluyeron a cualquier persona mayor de 18 años que cumpliera con los criterios de inclusión y exclusión enumerados en las siguientes tablas. La población de estudio incluyó dos grupos de sujetos (Grupo A, como se muestra en la Tabla 1, y Grupo B, como se muestra en la Tabla 2) con números aproximadamente iguales de cada uno (aproximadamente 100 sujetos por grupo):

Tabla 1: Grupo A - Ojos sanos

Sujetos sanos, criterios de inclusión	
1.	El sujeto debe tener 18 años de edad y puede ser de cualquier raza y género;
2.	El consentimiento informado aprobado por el IRB debe ser leído, firmado y fechado por el sujeto o el representante legalmente autorizado. Además, el consentimiento informado debe ser firmado y fechado por la persona que da su consentimiento al sujeto;
3.	El sujeto acepta que se tomen muestras de ambos ojos;
4.	El sujeto debe estar dispuesto a seguir los procedimientos del estudio y el calendario de visitas;
5.	El sujeto debe informar <2 en todos los síntomas (Cuestionario de Molestias Oculares Ora Calibra™ y 4 Síntomas) durante la visita;
6.	El sujeto tiene al menos uno de los siguientes en el o los ojos de la recogida: <ul style="list-style-type: none"> a. <2 en todas las regiones de la córnea (Escala Ora Calibra™) durante la visita; b. TFBUT > 10 segundos durante la visita.
Sujetos sanos, criterios de exclusión	
1.	El sujeto se quejó de ojo seco o cualquier otra enfermedad ocular aguda;
2.	El sujeto padece actualmente de inflamación o infección activa;

3. El sujeto ha usado gotas lagrimales artificiales en los últimos 2 meses;
4. Sujeto actualmente tratado médicamente por un síndrome ocular crónico tal como glaucoma, alergia o conjuntivitis;
5. El sujeto tiene una afección que, en opinión del investigador principal, interferiría con una participación óptima en el estudio, o que presentaría un riesgo especial para el sujeto;
6. El sujeto informa que actualmente está embarazada o amamantando;
7. Uso del fármaco de estudio en investigación o dispositivo de estudio dentro en los 30 días de la inclusión.

Tabla 2: Grupo B - Sospecha de ojo seco

Sospecha de ojo seco, criterios de exclusión
1. El sujeto debe tener 18 años de edad y puede ser de cualquier raza y género;
2. El consentimiento informado aprobado por el IRB debe ser leído, firmado y fechado por el sujeto o el representante legalmente autorizado. Además, el consentimiento informado debe ser firmado y fechado por la persona que da su consentimiento al sujeto;
3. El sujeto ha usado o ha tenido el el deseo de usar lágrimas artificiales en los últimos 30 días;
4. El sujeto informa ≥ 2 en al menos un síntoma (cuestionario de Molestia Ocular Ora Calibra™ y 4 Síntomas) durante la visita;
5. El sujeto demuestra los dos siguientes en el o los ojos de recogida: a. ≥ 2 en al menos una región (escala Ora Calibra™) b. TFBUT <10 segundos durante la visita;
6. El sujeto acepta que se tomen muestras de ambos ojos;
7. El sujeto debe estar dispuesto a seguir los procedimientos de estudio y el calendario de visitas.
Sospecha de ojo seco, criterios de exclusión
1. El sujeto está usando lentes de contacto de manera regular;
2. El sujeto padece actualmente inflamación o infección activa;
3. El sujeto ha usado Restasis® en los últimos 30 días;
4. El sujeto ha usado gotas lagrimales artificiales en la última hora;
5. El sujeto está siendo tratado médicamente para glaucoma;
6. El sujeto tiene una afección que, en opinión del Investigador Principal, interferiría con una participación óptima en el estudio o presentaría un riesgo especial para el sujeto;
7. El sujeto informa que actualmente está embarazada o amamantando;
8. El sujeto ha participado en cualquier otro ensayo clínico en los 30 días de la inclusión.

5 Un método ejemplar fue un estudio prospectivo, de centro único, de visita única, de grupos paralelos, de recogida de datos y lágrimas, que consiste en aproximadamente 200 sujetos. Hubo una visita de estudio programada donde los sujetos fueron cribados; los que cumplieron con los criterios de elegibilidad se incluyeron en el estudio.

Recogida de muestras lagrimales: el procedimiento para la recogida de muestras lagrimales fue el siguiente:

1. La lámpara de hendidura se fijó en un haz de baja intensidad.
- 10 2. El párpado inferior del ojo se retrajo y se colocó un tubo capilar de vidrio en el aspecto temporal que toca la superficie lagrimal.
3. Se contactó con la superficie lagrimal y se permitió la recogida de entre 6-25 microlitros de disolución lagrimal.
4. Una vez que se recogió un volumen suficiente (p. ej., pero no limitado a, 6-25 microlitros), se extrajo el contenido del capilar de vidrio y se vació en un vial. Si el volumen lagrimal estaba por debajo de 6 microlitros, se extrajo una segunda muestra del otro ojo en otro vial limpio.
- 15 5. Los viales se marcaron con una etiqueta de sujeto designada proporcionada por el patrocinador.
6. Los viales se almacenaron a una temperatura de 2 °c-8 °c. Las muestras lagrimales se transfirieron a los laboratorios del patrocinador para la preparación inicial hasta 48 horas después de la recogida antes de un análisis posterior de los niveles de lactoferrina.

7. El volumen lagrimal se midió en las 48 horas del muestreo utilizando una pipeta de pequeño volumen. Se añadieron dos volúmenes de muestra de disolución salina tamponada con fosfato (PBS X 1) a la muestra recogida, seguido de una breve agitación con vórtex (20 segundos) para mezclar. Las muestras diluidas se volvieron a colocar para su almacenamiento a una temperatura de 2 °C-8 °C.

5 Ensayo de lactoferrina: el ensayo permite la detección directa de la lactoferrina en lágrimas humanas usando la detección específica de grupos de azúcar de lactoferrina (es decir, una glicoproteína), usando un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. En primer lugar, se colocaron 20 µl de muestra lagrimal diluida 1:2.000 en la almohadilla de muestra. Luego, se colocaron 40 µl adicionales de disolución de lavado en la almohadilla de muestra para permitir que la muestra lagrimal migre y humedezca la almohadilla conjugada. La almohadilla conjugada contenía una primera lectina (p. ej., aglutinina de pisum stivum ("PSA")) conjugada con estreptavidina conjugada con partículas de oro (fabricada por Arista Biologicals Inc. 1101 Hamilton Street, Allentown, PA 18101) a través de la interacción biotina avidina. La lectina conjugada unió a la lactoferrina de la muestra lagrimal y migró a través de la membrana de nitrocelulosa hacia la mecha. Cuando los complejos de conjugado de oro/lactoferrina alcanzaron la zona de ensayo, el conjugado de oro/lactoferrina se unió a la segunda lectina (p. ej., aglutinina de lens culinaris ("LCA")) fijada a la superficie de la membrana (es decir, en la línea de ensayo). La acumulación del conjugado de oro/lactoferrina unido a la línea de ensayo forma una línea visible de color rojo rosado. Una cantidad excesiva de complejo migró entonces a una segunda zona que contenía biotina BSA que se une al conjugado de estreptavidina oro. Se forma una segunda línea (una línea control). La línea control indicaba la validez del ensayo. Una cantidad residual de conjugado y muestra lagrimal migró desde la membrana de nitrocelulosa a la almohadilla de mecha.

20 La tira reactiva se produjo de la siguiente manera: 1 mg/ml (0,75-1,5 mg/ml) de LCA se impregnó en una membrana cromatográfica de nitrocelulosa (p. ej., membrana de nitrocelulosa de Whatman, FF120, pero también puede ser membrana mdi CNPH-N-5560). La LCA se impregnó en la tira reactiva en la forma de una línea de 1 mm de ancho. La disolución de LCA contiene adicionalmente lo siguiente: (1) tampón, p. ej., disolución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 o tampón Tris, HEPES, Borax o MES con un valor de pH que oscila entre 6,5-9,0; (2) trehalosa o sacarosa al 2 %, con una concentración del 1 %-4 %; (3) etanol al 1-4 % (p. ej., pero no limitado a, etanol al 1 %, 2 %, 3 %, 4 %). La nitrocelulosa impregnada con LCA se secó a 50 grados C durante 10 minutos para unir la proteína a la nitrocelulosa. La unión de la LCA a la nitrocelulosa también puede ocurrir entre 37-60 grados C durante 5 a 24 horas, donde una temperatura más alta permitiría un tiempo de incubación más corto. La biotina se unió a PSA mediante la conjugación de biotina con PSA en una relación de, p. ej., pero no limitado a, 11:1, 22:1 o 33:1. La biotina-PSA se unió al conjugado de estreptavidina oro en una relación de 5 µg/ml de biotina-PSA (pero puede variar de 1 µg/ml a 7 µg/ml de concentración) y entre DO0,5/ml - DO2,0/ml, p. ej., pero no limitado a, DO1/ml, oro-estreptavidina. El complejo de reacción también puede incluir reactivo de lavado, que elimina el exceso de conjugados de oro de la membrana de nitrocelulosa. El reactivo de lavado puede contener lo siguiente: (1) PBS x 1 a pH 7,4 (puede variar de pH 7,0-9,0); (2) albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 1 % (puede variar del 0,5 %-3,0 %); (3) Tween 20 al 0,1 % (puede variar del 0,05 %-2,0 %); (4) dodecilsulfato de sodio al 0,05 % (puede variar del 0,01 %-1 %), o cualquier combinación de los mismos. Con respecto a la Figura 1, la intensidad de línea de 1 se forma cuando la lactoferrina se mide a 50 µg/ml (es decir, muestra la equivalencia entre la intensidad de línea y la concentración de lactoferrina).

Ensayo de tiempo de ruptura de la película lagrimal: el procedimiento para TFBUT incluyó:

- 40 1. Un profesional médico instiló 5 µL de disolución de fluoresceína sódica sin conservantes al 2 % en el fondo del saco conjuntival inferior de cada ojo. Para mezclar completamente la fluoresceína con la película lagrimal, se le indicó al sujeto que parpadeara varias veces. Con el fin de lograr la máxima fluorescencia, el profesional médico esperó aproximadamente 30 segundos después de la instilación antes de evaluar el TFBUT.
- 45 2. Con la ayuda de una lámpara de hendidura, el profesional médico monitorizó la integridad de la película lagrimal y observó el tiempo que lleva formar las micelas desde el momento en que se abrió el ojo. El TFBUT se midió en segundos usando un cronómetro y un sistema de grabación de imagen digital para el ojo derecho seguido del ojo izquierdo. Se utilizó un filtro amarillo Wratten #12 para mejorar la capacidad de calificar el TFBUT.
- 50 3. Para cada ojo, se tomaron y promediaron dos mediciones a menos que las dos mediciones estuvieran separadas por más de 2 segundos y cada una tuviera menos de 10 segundos, en cuyo caso, se tomó una tercera medición y se promediaron las dos de las tres más cercanas.

Tinción de fluoresceína corneal: El procedimiento para la fluoresceína corneal incluyó:

1. Con el fin de lograr la máxima fluorescencia, el profesional médico esperó aproximadamente 3-5 minutos después de la instilación antes de evaluar la tinción de fluoresceína. Se usó un filtro amarillo Wratten #12 para mejorar la capacidad de clasificar la tinción de fluoresceína.
- 55 2. El inter-palpebral se calificó y registró, y la conjuntiva y la córnea epitelial se tiñeron mediante el uso de una escala de 5 puntos (p. ej., imágenes de tiras/panel escaneados que tenían una intensidad de línea que representaba un grado de la escala de intensidades). El párpado superior se levantó ligeramente para calificar toda la superficie corneal. Con respecto a la conjuntiva, la calificación de la zona temporal se realizó cuando

9. El personal clínico revisó los resultados para determinar si el paciente cumplía con todos los criterios de inclusión/exclusión basados en los datos recogidos según los puntos 3-8.
10. A los pacientes que cumplían con todos los criterios se les asignó un número de estudio sujeto y se clasificaron en la etiqueta sobre la base del diagnóstico de paciente sano o con sospecha de ojo seco.
- 5 11. Los eventos adversos, si es aplicable, fueron documentados.

Las muestras fueron manejadas y ensayadas usando los siguientes parámetros:

1. El volumen de las lágrimas recogidas se midió usando una micropipeta. Se añadió el doble del volumen medido con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) para una dilución final de 1:3.
- 10 2. Las lágrimas diluidas se diluyeron adicionalmente en serie a las siguientes diluciones: 1:50, 1:100 y 1:200 con PBS.
3. Se mezclaron dos microlitros de muestra diluida con 18 microlitros de mezcla de conjugado de oro en un microtubo. La tira reactiva relevante se sumergió en esa mezcla durante 4 minutos.
4. Se añadieron 25 microlitros adicionales de disolución de lavado al tubo para eliminar el exceso de colorante de la zona de reacción.
- 15 5. Después de 6 minutos, las tiras reactivas desarrolladas se secaron suavemente contra papel de seda y se escanearon con un escáner de escritorio.
6. La intensidad del ensayo se cuantificó según la escala de intensidad presentada en la Figura 2.

Análisis de potencia: la Tabla 3 presenta la potencia para tamaños de muestra seleccionados.

Tabla 3

Objetivo de rendimiento	Proporción de muestra	N	Potencia
0,55	0,70	95	0,82
	0,72	75	0,82
	0,75	50	0,84
0,60	0,70	100	0,55
	0,72	100	0,71
	0,75	90	0,84
0,65	0,70	100	0,16
	0,72	100	0,29
	0,75	100	0,55

20 La potencia se estimó usando el método exacto binomial, donde se tuvieron en cuenta dos puntos finales coprimarios (sensibilidad y especificidad), y donde "N" representa el número de casos positivos solamente (o negativos solamente). Por lo tanto, el tamaño total de la muestra se duplicó.

25 La Tabla 4 ilustra un parámetro de "Precisión", que se define como la mitad del intervalo de confianza (IC). El IC es una estimación de intervalo de un parámetro de población. El IC es un intervalo observado (es decir, se calcula a partir de las observaciones), en principio diferente de una muestra a otra, que con frecuencia incluye el parámetro de interés si el experimento se repite.

Tabla 4

Tamaño de la muestra	Número obtenido de respondedores	Tasa obtenida	IC inferior al 95 %	IC superior al 95 %	Precisión
80	48	60,0 %	48,4 %	70,8 %	11,2 %
	52	65,0 %	53,5 %	75,4 %	11,0 %
	56	70,0 %	58,7 %	79,8 %	10,6 %
	60	75,0 %	64,0 %	84,1 %	10,1 %
	64	80,0 %	69,5 %	88,2 %	9,4 %

	68	85,0 %	75,2 %	92,1 %	8,5 %
	72	90,0 %	81,2 %	95,6 %	7,2 %
90	54	60,0 %	49,1 %	70,2 %	10,6 %
	59	65,6 %	54,7 %	75,3 %	10,3 %
	63	70,0 %	59,4 %	79,3 %	10,0 %
	68	75,6 %	65,3 %	84,1 %	9,4 %
	72	80,0 %	70,2 %	87,7 %	8,8 %
	77	85,6 %	76,5 %	92,1 %	7,8 %
	81	90,0 %	81,8 %	95,4 %	6,8 %
100	60	60,0 %	49,7 %	69,7 %	10,0 %
	65	65,0 %	54,8 %	74,3 %	9,8 %
	70	70,0 %	60,0 %	78,8 %	9,4 %
	75	75,0 %	65,3 %	83,2 %	9,0 %
	80	80,0 %	70,8 %	87,4 %	8,3 %
	85	85,0 %	76,4 %	91,4 %	7,5 %
	90	90,0 %	82,3 %	95,1 %	6,4 %

Resultados y análisis

5 El resultado primario del estudio fue la comparación de ensayos de referencia para el ojo seco tales como TFBUT, tinción corneal, ensayo de Schirmer y cuestionarios OSDI con resultados de un ensayo de componentes de la película lagrimal (p. ej., lactoferrina).

10 Todas las muestras recogidas obtenidas de los ojos de los pacientes que cumplieron con los criterios de entrada se incluyeron en los análisis. El objetivo del estudio fue desarrollar una herramienta de evaluación para comparar los ensayos de referencia para el ojo seco con un kit que ensaya el compuesto de la película lagrimal, lactoferrina. Los datos se distribuyeron de valores menores a mayores y se compararon con otros parámetros para identificar correlaciones positivas y negativas. La Figura 2 ilustra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo con la concentración de analito. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de la línea de ensayo reducida se correlaciona con un ensayo para ojo seco (p. ej., ensayo de Schirmer, tinción corneal, OSDI, etc.).

15 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de lactoferrina en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 1 a 4 µg/ml se correlaciona con un resultado más alto detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, OSDI y TFBUT.

20 El tamaño de la muestra en este estudio piloto (198 ojos en total, 99 por grupo) no se basó en ningún análisis de potencia, sino que se basó en una aproximación del número de ojos suficiente para construir un modelo para distinguir entre lágrimas sanas y con sospecha de ojo seco y la evaluación de ensayos estándar de referencia con los diferentes parámetros ensayados.

25 Los eventos adversos (EA) incluyeron cualquier evento reportado en el transcurso de la recogida de lágrimas y los procedimientos de evaluación de la superficie ocular. Este estudio clínico incluyó TFBUT, tinción corneal y la recogida de lágrimas para el análisis de los constituyentes. Durante estos ensayos, el participante puede haber sentido una sensación de cuerpo extraño. Durante la recogida de lágrimas puede haber casos de contacto directo con el ojo debido al movimiento, lo que da lugar a abrasión corneal o enrojecimiento de los ojos. Cualquiera de dichos eventos se anotó y calificó de la siguiente manera:

Leve: Signo o síntoma, generalmente transitorio, que no requiere un tratamiento especial, que generalmente no interfiere con las actividades habituales.

Moderado: Signo o síntoma, que puede mejorarse con simples medidas terapéuticas; puede interferir con la actividad habitual.

Grave: Signo o síntoma que es intenso o debilitante y que interfiere con las actividades habituales. La recuperación generalmente fue asistida por medidas terapéuticas.

Un total de 198 sujetos completaron el estudio, incluyendo 126 mujeres y 72 hombres. El desglose de los sujetos según los criterios de entrada A o B se describe en la Tabla 5 a continuación. Aquellos que cumplieron con los criterios de entrada no fueron emparejados por edad o género en este estudio.

Tabla 5

	Hombres	Mujeres	edad media
Grupo A Sano	41	59	45,5
Grupo B con sospecha de DE	31	67	58,6

5

Los sujetos incluidos en cada grupo del estudio cumplieron con los criterios de entrada bien de ojo sano o con sospecha de ojo seco. El único criterio demográfico que mostró una diferencia significativa entre los dos grupos fue la edad; el análisis preliminar no mostró diferencias significativas en las métricas lagrimales entre los dos grupos. Además, ambos grupos mostraron un rango de valores para los parámetros de ensayo de referencia. En base a esta observación, todos los sujetos se agruparon en un solo grupo y se analizaron usando cuartiles de población con la asunción de que la población muestreada representaba un continuo de gravedad del ojo seco. Usando este concepto, se clasificaron las mediciones para cada uno de los ensayos de referencia, y los valores medios para cada uno de los 4 cuartiles se compararon con las medidas para el diagnóstico lagrimal.

10

Análisis de cuartiles: El análisis de cuartiles para los ensayos de TFBUT, tinción inferior y de Schirmer se resumen en la Tabla 6. El enfoque de esta estrategia estaba en los extremos, los cuartiles 1 y 4, ya que representan a aquellos pacientes con las mayores diferencias para cada medición. En las tres mediciones, Q1 fue el cuartil con valores esperados para pacientes normales y Q4 fue el cuartil con valores asociados con la enfermedad del ojo seco. Por ejemplo, aquellos en Q1 tienen un TFBUT medio de 12,80 segundos y, por lo tanto, se considerarían normales, mientras que aquellos en Q4 tienen un TFBUT medio de 2,34 segundos, lo que es consistente con un diagnóstico de enfermedad moderada del ojo seco. Cuando se compararon los valores medios para los parámetros ensayados en cada uno de los cuartiles definidos por TFBUT, surgieron asociaciones entre la medición del tiempo de ruptura y la dinámica de los constituyentes lagrimales. La disminución en TFBUT entre Q1 y Q4 estuvo acompañada por un aumento en la lactoferrina. La tinción inferior aumenta de Q1 a Q4, y este aumento se correlacionó significativamente con un aumento de la lactoferrina. Los cuartiles definidos por las puntuaciones de Schirmer exhibieron correlaciones negativas significativas: mientras que la puntuación media de Schirmer bajó de Q1 a Q4, los valores de lactoferrina aumentaron y mostraron una diferencia significativa entre Q1 y Q4. Esta correlación negativa se debió a la naturaleza de las puntuaciones de Schirmer, donde los valores más altos (Q1) indicaron una producción lagrimal saludable.

15

20

25

La Tabla 6 muestra el análisis de cuartiles para TFBUT, tinción inferior y ensayo de Schirmer. Los valores del ensayo t, cuando fueron significativos (menos de 0,05), están resaltados en negrita.

30

Tabla 6

TFBUT				Valores medios
	Media	n	% de ojos	Lactoferrina
Q1	12,80	48	24,6 %	0,979
Q4	2,34	48	24,6 %	1,099
Q4-Q1	-10,46			0,120
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,037
Tinción inferior				
	Media	n	% de ojos	Lactoferrina
Q1	0,42	52	27,5 %	0,596
Q4	2,25	59	31,2 %	0,808
Q4-Q1	1,83			0,212
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,003
Ensayo de Schirmer				
	Media	n	% de ojos	Lactoferrina
Q1	32,44	52	26,40 %	0,587
Q4	5,21	52	26,40 %	0,803
Q4-Q1	-27,23			0,216
Q1 frente a Q4, ensayo t				> 0,001

5 Una segunda ronda de análisis de cuartiles usó la misma estrategia para determinar si los cuartiles definidos por los valores de los constituyentes lagrimales muestran correlaciones similares con otras mediciones de los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco. Estos datos se muestran en la Tabla 7. Tabla 7. Análisis de cuartiles para lactoferrina. Los valores del ensayo t, cuando fueron significativos (< 0,05), están resaltados en negrita.

Tabla 7

Lactoferrina		Valores medios							
	Medias	N	% de ojos	TFBUT	OSDI	Molestia ocular Ora Calibra	Inferior	Suma corneal	de Schirmer
Q1	0,42	90	45,45 %	6,19	13,66	1,12	1,14	2,66	19,22
Q4	1,05	57	28,79 %	5,79	15,35	1,44	1,56	3,41	13,28
Q1-Q4				0,40	-1,69	-0,32	-0,42	-0,76	5,94
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,603	0,544	0,167	0,001	0,010	0,001

10 Los cuartiles asociados con la proteína lactoferrina de la glándula lagrimal mostraron una diferencia significativa para las medidas de tinción corneal, con la tinción corneal inferior y total que muestra una correlación positiva con aumentos en los niveles de proteína de Q1 a Q4.

Discusión

El estudio actual ilustró la heterogeneidad de las dos poblaciones de sujetos incluidos originalmente para el análisis. A pesar de su inclusión basada en criterios diferenciales para la sintomatología, TFBUT y tinción corneal, no se identificaron diferencias significativas entre las dos poblaciones en el análisis de los constituyentes lagrimales.

15 En algunos aspectos de la descripción, hay un método para medir el ojo seco, que incluye el análisis de constituyentes lagrimales. En algunos aspectos de la descripción, hay un método para medir el ojo seco, que incluye el análisis de los constituyentes lagrimales y la comparación del análisis de los constituyentes lagrimales con ensayos tales como, pero no limitado a, el ensayo de Schirmer, TFBUT, etc., para obtener información para tratar a un paciente diagnosticado con enfermedad del ojo seco.

20 Los análisis de cuartiles muestran las relaciones entre las mediciones tradicionales y los parámetros ensayados que forman parte de los constituyentes lagrimales. Una excepción a esto es TFBUT, que muestra solo correlaciones modestas con cualquiera de los constituyentes lagrimales medidos. En contraste, las medidas de tinción corneal (tal como la tinción inferior, Tabla 6) están bien correlacionadas con los cambios en los parámetros ensayados. Esto es consistente con un diagnóstico de ojo seco evaporativo, donde una reducción en el contenido acuoso de las lágrimas produciría aumentos aparentes en las concentraciones de todos los constituyentes lagrimales. Alternativamente, los aumentos en las concentraciones de los constituyentes lagrimales pueden ser el resultado de una respuesta inflamatoria al estrés negativo de la superficie ocular que inicia un cambio en la relación de secreciones lagrimales graves a mucosas. Además, mayores cantidades de lactoferrina se correlacionan con una mayor tinción y puntuaciones más bajas de Schirmer; además, la lactoferrina muestra una correlación significativa con un TFBUT más bajo.

30 En algunos aspectos de la descripción, el método incluye el uso de al menos un ensayo de diagnóstico. En algunos aspectos de la descripción, al realizar dicha comparación de constituyentes lagrimales en sujetos sanos y con ojo seco, se obtiene un efecto multiplicativo. En algunos aspectos de la descripción, se usa un kit para proporcionar una evaluación entre pacientes graves y sujetos sanos.

35 Ejemplo 2: Medición de lisozima en muestras lagrimales

40 Se examinaron los niveles de un constituyente lagrimal prominente en sujetos sanos y en sujetos que cumplían uno o más criterios de ojo seco leve a moderado. Los siguientes experimentos ilustran una comparación entre los ensayos de referencia para la evaluación del ojo seco con una medida cuantitativa de un constituyente lagrimal. Los ejemplos de los ensayos usados para medir cuantitativamente al menos un constituyente lagrimal son la tinción corneal, los ensayos de Schirmer, TFBUT y la evaluación de los síntomas proporcionados incluyendo el cuestionario OSDI y la puntuación de molestia ocular Ora-Calibra™. El OSDI es una evaluación de 12 preguntas que se ha convertido en un estándar para la sintomatología del ojo seco. Las evaluaciones de malestar de Ora-Calibra también proporcionan una medición de la sintomatología al permitir que un paciente responda preguntas, donde el número de preguntas se reduce en comparación con el OSDI. Se recogieron muestras lagrimales usando tubos capilares y luego se analizaron para el constituyente lagrimal. El constituyente lagrimal medido fue la lisozima.

Ensayo de constituyente lagrimal y metodología de medición

Se usaron tiras reactivas rápidas (tiras de análisis lagrimal) y reactivos para medir los niveles de lactoferrina usando una técnica semicuantitativa; donde la técnica semicuantitativa siguió un tiempo de ejecución fijo para cada tipo de ensayo, las tiras se escanearon con el modelo de escáner HP scanjet 200. La figura escaneada se optimizó usando la función Aclarar/Oscurecer:

- 5 Destacados - (-) 50; Sombras - (-) 69; Medios tonos - (-) 50; Gamma-1,7 seguido por el registro de la intensidad de la señal (que se muestra en la Figura 4). La determinación del constituyente lagrimal se realizó usando una estimación semicuantitativa de las líneas de ensayo de intensidad en comparación con la intensidad de una serie de líneas control.

Diseño experimental

- 10 Población de sujetos: los sujetos para el estudio incluyeron a cualquier persona mayor de 18 años que cumpliera con los criterios de inclusión y exclusión enumerados en las siguientes tablas. La población de estudio incluyó dos grupos de sujetos (Grupo A, como se muestra en la Tabla 1 en el Ejemplo 1 anterior, y Grupo B, que se muestra en la Tabla 2 en el Ejemplo 1 anterior) con números aproximadamente iguales de cada uno (aproximadamente 100 sujetos por grupo):

- 15 Un método ejemplar fue un estudio prospectivo, de centro único, de visita única, de grupos paralelos, de recogida de datos y lágrimas, que consistió en aproximadamente 200 sujetos. Hubo una visita de estudio programada donde los sujetos fueron cribados; aquellos que cumplieron con los criterios de elegibilidad se incluyeron en el estudio.

Recogida de muestras lagrimales: el procedimiento para la recogida de muestras lagrimales se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

- 20 Ensayo de lisozima: el ensayo permite la detección directa de la lisozima en lágrimas humanas usando anticuerpos específicos que reconocen la enzima. La tira reactiva utiliza tecnología inmunocromatográfica de flujo lateral semicuantitativa. Una muestra lagrimal se diluye 1:200 con tampón de disolución salina de fosfato (es decir, además de la dilución 1:3 inicial de la lágrima). Se colocan 10 µl de muestra diluida 1:200 en la almohadilla de muestra. 40 µl adicionales de disolución de lavado permiten que la muestra lagrimal migre, humedeciendo una almohadilla conjugada. 25 Los anticuerpos policlonales específicos de oveja conjugados con partículas de oro se unen a la lisozima. Los anticuerpos conjugados unidos a la lisozima fluyen a través de la membrana de nitrocelulosa. Cuando el complejo de conjugado de oro/lisozima alcanza la zona de ensayo, reacciona con un anticuerpo secundario anti-lisozima de oveja fijado a la superficie de la membrana. Una segunda zona en la nitrocelulosa está impregnada (p. ej., con anticuerpos anti-oveja de cabra) y está configurada para unirse al conjugado anti-lisozima-oro de oveja. Se forma una segunda línea y se denomina línea control. La línea control indica la validez del ensayo. En particular, los dos anticuerpos anti-lisozima (es decir, un anti-lisozima de oveja o un anti-lisozima de conejo) pueden reconocer diferentes epítomos en la enzima. 30

- En un aspecto ejemplar de la descripción, se impregnaron 1,5 mg/ml (0,75-2,5 mg/ml) de anti lisozima de oveja en una membrana cromatográfica de nitrocelulosa con alta capacidad de unión a proteínas (p. ej., pero no limitado a, mdi CNPH-N-5560). La impregnación se visualizó, p. ej., pero no limitado a, a simple vista, como una línea de 1 mm de ancho. La disolución de anticuerpos contenía lo siguiente: a. Tampón, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 o tampón Tris, HEPES, Borax o MES con un valor de pH que varía entre 6,5 y 9,0; b. trehalosa al 2% (también puede ser sacarosa), también puede variar entre azúcar al 1 % al 4 %; c. etanol al 2 %, también puede variar del 1 al 4 %. 35

- 40 La nitrocelulosa impregnada de anticuerpo se secó a 50 °C durante 10 min para permitir la fijación de la proteína a la nitrocelulosa. En un aspecto de la descripción, la unión puede ocurrir entre 60 °C y 37 °C durante 5 a 24 horas, según la modulación de la temperatura (p. ej., una unión más rápida a temperaturas más altas).

- En un aspecto ejemplar de la descripción, la anti-lisozima de oveja se conjuga con partículas de oro (p. ej., 20 nm, 40 nm, 60 nm o 100 nm) en una relación de 4 µg de proteína por DO1 por ml de oro coloidal a 528 nm. La conjugación se realizó en condiciones de pH de entre pH 7 y pH 9, p. ej., pH8. 45

- Una concentración efectiva del conjugado de oro puede variar de DO0,5/ml a DO 2/ml. Se añadieron 30 µg/ml de anti lisozima de oveja libre (también se puede usar anti lisozima de conejo) a la disolución de conjugado para ajustar la sensibilidad del ensayo. La intensidad de la línea se estimó (es decir, se midió semicuantitativamente) visualmente como se muestra en la Figura 4. Se formó una intensidad de línea de 1 cuando la lisozima estaba a una concentración de 25 µg/ml (mostrando, p. ej., equivalencia entre la intensidad de línea y la concentración de lisozima). La mezcla de reacción también incluye reactivo de lavado (WR) que proporciona un entorno químico, así como la eliminación de residuos de oro de la membrana de nitrocelulosa. El WR contiene lo siguiente: (a) PBS X 1 pH 7,4 (puede variar de 7 a 9), (b) albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % puede variar del 0,5 al 3 % y está libre de ácidos grasos), (c) Tween 20 entre el 0,05 % y 2 %, p. ej., pero no limitado a, Tween 20 al 0,1 %, (d) N-laurilil sarcosina al 0,05 % y PEG al 0,4 % para reducir la unión no específica a la membrana de nitrocelulosa, donde la concentración de N-laurilil sarcosina fue del 0,01-1 %. 50 55

Ensayo del tiempo de ruptura de la película lagrimal: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Tinción de fluoresceína corneal: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Ensayo de Schirmer sin anestésico: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

5 Escala de molestias oculares Ora Calibra™: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Cuestionario de molestias oculares Ora Calibra™ y 4 síntomas: el cuestionario se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

10 Se siguieron los estándares de atención profesional para proteger la seguridad ocular de los sujetos con respecto al cumplimiento del régimen de estudio. Los sujetos que cumplieron con los criterios de entrada proporcionaron información demográfica, antecedentes médicos y oculares y uso de lágrimas artificiales, si es apropiado. El personal clínico confirmó que los sujetos no usaron lágrimas artificiales en la hora anterior al estudio, luego guio a los sujetos a través de los siguientes procedimientos:

- 15 1. Los sujetos completaron el cuestionario OSDI© y el cuestionario de molestias oculares Ora Calibra™ y de 4 síntomas.
2. Los sujetos y el personal revisaron los documentos fuente para confirmar que el sujeto cumplía con todos los criterios de inclusión/exclusión basados en los medicamentos actuales y el historial médico.
- 20 3. El personal clínico recogió 6-25 microlitros de lágrimas usando un capilar del ojo derecho del sujeto. El personal etiquetó el vial de recogida con el número de cribado del sujeto y vació el contenido del capilar en el vial.
4. En los casos en los que el volumen lagrimal recogido del ojo derecho era inferior a 6 microlitros, se extrajo una muestra del ojo izquierdo y el capilar se vació en otro vial limpio marcado con el mismo número de cribado del sujeto.
5. El personal clínico realizó un ensayo de tiempo de ruptura de la película lagrimal en el o los ojos de recogida.
- 25 6. El personal clínico realizó la tinción de fluoresceína corneal y examinó la superficie ocular del ojo o de los ojos de recogida.
7. Si se recogieron 6 o más microlitros del ojo derecho, pero el sujeto no cumplió con los criterios de inclusión de ruptura de la película lagrimal o tinción de fluoresceína en el ojo derecho, las etapas 3-6 se repitieron en el ojo izquierdo.
- 30 8. El personal clínico realizó el ensayo de Schirmer sin anestésico en el o los ojos de recogida.
9. El personal clínico revisó los resultados para determinar si el paciente cumplía con todos los criterios de inclusión/exclusión en función de los datos recogidos según los puntos 3-8.
10. A los pacientes que cumplieran con todos los criterios se les asignó un número de estudio sujeto y se clasificaron en la etiqueta según el diagnóstico de paciente sano o con sospecha de ojo seco.
- 35 11. Los eventos adversos, si es aplicable, fueron documentados.

Las muestras fueron manejadas y ensayadas usando los siguientes parámetros:

1. El volumen de las lágrimas recogidas se midió usando una micropipeta. Se añadió el doble del volumen medido con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) para una dilución final de 1:3.
- 40 2. Las lágrimas diluidas se diluyeron adicionalmente en serie a las siguientes diluciones: 1:50, 1:100 y 1:200 con PBS.
3. Se mezclaron dos microlitros de muestra diluida con 18 microlitros de mezcla de conjugado de oro en un microtubo. La tira reactiva relevante se sumergió en esa mezcla durante 4 minutos.
4. Se añadieron 25 microlitros adicionales de disolución de lavado al tubo para eliminar el exceso de colorante de la zona de reacción.
- 45 5. Después de 6 minutos, las tiras reactivas desarrolladas se secaron suavemente contra papel de seda y se escanearon con un escáner de escritorio.

6. La intensidad del ensayo se cuantificó según la escala de intensidad presentada en la Figura 4.

Análisis de potencia: la Tabla 8 presenta la potencia para tamaños de muestra seleccionados.

Tabla 8

Objetivo de rendimiento	Proporción de muestra	N	Potencia
0,55	0,70	95	0,82
	0,72	75	0,82
	0,75	50	0,84
0,60	0,70	100	0,55
	0,72	100	0,71
	0,75	90	0,84
0,65	0,70	100	0,16
	0,72	100	0,29
	0,75	100	0,55

5 La potencia se estimó usando el método exacto binomial, donde se tuvieron en cuenta dos puntos finales coprimarios (sensibilidad y especificidad), y donde "N" representa el número de casos positivos solamente (o negativos solamente). Por lo tanto, el tamaño total de la muestra se duplicó.

10 La Tabla 9 ilustra un parámetro de "Precisión", que se define como la mitad del intervalo de confianza (IC). El IC es una estimación de intervalo de un parámetro de población. El IC es un intervalo observado (es decir, se calcula a partir de las observaciones), en principio diferente de una muestra a otra, que con frecuencia incluye el parámetro de interés si el experimento se repite.

Tabla 9

Tamaño de la muestra	Número obtenido de respondedores	Tasa obtenida	IC inferior al 95 %	IC superior al 95 %	Precisión
80	48	60,0 %	48,4 %	70,8 %	11,2 %
	52	65,0 %	53,5 %	75,4 %	11,0 %
	56	70,0 %	58,7 %	79,8 %	10,6 %
	60	75,0 %	64,0 %	84,1 %	10,1 %
	64	80,0 %	69,5 %	88,2 %	9,4 %
	68	85,0 %	75,2 %	92,1 %	8,5 %
	72	90,0 %	81,2 %	95,6 %	7,2 %
90	54	60,0 %	49,1 %	70,2 %	10,6 %
	59	65,6 %	54,7 %	75,3 %	10,3 %
	63	70,0 %	59,4 %	79,3 %	10,0 %
	68	75,6 %	65,3 %	84,1 %	9,4 %
	72	80,0 %	70,2 %	87,7 %	8,8 %
	77	85,6 %	76,5 %	92,1 %	7,8 %
100	81	90,0 %	81,8 %	95,4 %	6,8 %
	60	60,0 %	49,7 %	69,7 %	10,0 %
	65	65,0 %	54,8 %	74,3 %	9,8 %
	70	70,0 %	60,0 %	78,8 %	9,4 %
	75	75,0 %	65,3 %	83,2 %	9,0 %
	80	80,0 %	70,8 %	87,4 %	8,3 %
	85	85,0 %	76,4 %	91,4 %	7,5 %
90	90,0 %	82,3 %	95,1 %	6,4 %	

Resultados y análisis

El resultado primario del estudio fue la comparación de los ensayos de referencia para el ojo seco tales como TFBUT, tinción corneal, ensayo de Schirmer y cuestionarios OSDI con los resultados de un ensayo de constituyentes de la película lagrimal (p. ej., lisozima).

5 Todas las muestras recogidas obtenidas de los ojos de los pacientes que cumplieron con los criterios de entrada se incluyeron en los análisis. El objetivo del estudio fue desarrollar una herramienta de evaluación para comparar los ensayos de referencia para el ojo seco con un kit que ensaya el compuesto de la película lagrimal, la lisozima. Los datos se distribuyeron de los valores menores a mayores y se compararon con otros parámetros para identificar correlaciones positivas y negativas. La Figura 4 ilustra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo con la concentración de analito. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de línea de ensayo reducida se correlaciona con un ensayo para ojo seco (p. ej., ensayo de Schirmer, tinción corneal, OSDI, etc.).

10 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de lisozima en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 1 µg/ml se correlaciona con un resultado más bajo detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, OSDI y TFBUT.

15 El tamaño de la muestra en este estudio piloto (198 ojos totales, 98 por grupo) no se basó en ningún análisis de potencia, sino que se basó en una aproximación del número de ojos suficiente para construir un modelo para distinguir entre lágrimas sanas y con sospecha de ojo seco y evaluación de ensayos estándar de referencia con los diferentes parámetros ensayados.

20 Los eventos adversos (EA) incluyeron cualquier evento reportado en el transcurso de la recogida de lágrimas y los procedimientos de evaluación de la superficie ocular. Este estudio clínico incluyó TFBUT, tinción corneal y la recogida de lágrimas para el análisis de los constituyentes. Durante estos ensayos, el participante puede haber sentido una sensación de cuerpo extraño. Durante la recogida de lágrimas puede haber casos de contacto directo con el ojo debido al movimiento, lo que da lugar a abrasión corneal o enrojecimiento de los ojos. Cualquiera de dichos eventos se anotó y calificó de la siguiente manera:

Ligero: Signo o síntoma, generalmente transitorio, que no requiere un tratamiento especial, que generalmente no interfiere con las actividades habituales.

Moderado: Signo o síntoma, que puede mejorarse con simples medidas terapéuticas; puede interferir con la actividad habitual.

Grave: Signo o síntoma que es intenso o debilitante y que interfiere con las actividades habituales. La recuperación generalmente fue asistida por medidas terapéuticas.

Un total de 198 sujetos completaron el estudio, incluyendo 126 mujeres y 72 hombres. El desglose de los sujetos según los criterios de entrada A o B se describe en la Tabla 10 a continuación. Aquellos que cumplieron con los criterios de entrada no fueron emparejados por edad o género en este estudio.

Tabla 10

	Hombres	Mujeres	edad media
Grupo A Sano	41	59	45,5
Grupo B con sospecha de DE	31	67	58,6

30 Los sujetos incluidos en cada grupo de estudio cumplieron con los criterios de entrada de ojo sano o con sospecha de ojo seco. El único criterio demográfico que mostró una diferencia significativa entre los dos grupos fue la edad; el análisis preliminar no mostró diferencias significativas en las mediciones lagrimales entre los dos grupos. Además, ambos grupos mostraron un rango de valores para los parámetros de ensayo de referencia. En base a esta observación, todos los sujetos se agruparon en un solo grupo y se analizaron usando cuartiles de población con la asunción de que la población muestreada representaba un continuo de gravedad del ojo seco. Usando este concepto, se clasificaron las mediciones para cada uno de los ensayos de referencia, y los valores medios para cada uno de los 4 cuartiles se compararon con las medidas para el diagnóstico lagrimal.

35 Análisis de cuartiles: el análisis de cuartiles para los ensayos de TFBUT, tinción inferior y de Schirmer se resumen en la Tabla 11. El enfoque de esta estrategia estaba en los extremos, los cuartiles 1 y 4, ya que representan a aquellos pacientes con las mayores diferencias para cada medición. En las tres medidas, Q1 fue el cuartil con valores esperados para pacientes normales y Q4 fue el cuartil con valores asociados con la enfermedad del ojo seco. Por ejemplo, aquellos en Q1 tienen un TFBUT medio de 12,80 segundos y, por lo tanto, se considerarían normales, mientras que

- 5 aquellos en Q4 tienen un TFBUT medio de 2,34 segundos, lo que es consistente con un diagnóstico de enfermedad moderada del ojo seco. Cuando se compararon los valores medios para los parámetros ensayados en cada uno de los cuartiles definidos por TFBUT, surgieron asociaciones entre la medición del tiempo de ruptura y la dinámica de los constituyentes lagrimales. La disminución en TFBUT entre Q1 y Q4 estuvo acompañada por una disminución en la lisozima. La tinción inferior aumenta de Q1 a Q4, y este aumento se correlacionó significativamente con un aumento de la lisozima. Los cuartiles definidos por las puntuaciones de Schirmer exhibieron correlaciones negativas significativas: mientras que la puntuación media de Schirmer bajó de Q1 a Q4, los valores para la lisozima aumentaron y mostraron una diferencia significativa entre Q1 y Q4. Esta correlación negativa se debió a la naturaleza de las puntuaciones de Schirmer, donde los valores más altos (Q1) indicaron una producción lagrimal sana.
- 10 La Tabla 11 muestra el análisis de cuartiles para TFBUT, tinción inferior y ensayo de Schirmer. Los valores del ensayo t, cuando son significativos (< 0,05), están resaltados en negrita.

Tabla 11

TFBUT			Valores medios	
	Media	n	% de ojos	Lisozima
Q1	12,80	48	24,6 %	0,734
Q4	2,34	48	24,6 %	0,541
Q4-Q1	-10,46			-0,194
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,053
Tinción inferior				
	Media	n	% de ojos	Lisozima
Q1	0,42	52	27,5 %	0,434
Q4	2,25	59	31,2 %	0,757
Q4-Q1	1,83			0,323
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,010
Ensayo de Schirmer				
	Media	n	% de ojos	Lisozima
Q1	32,44	52	26,40 %	0,509
Q4	5,21	52	26,40 %	0,797
Q4-Q1	-27,23			0,289
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,002

- 15 Una segunda ronda de análisis de cuartiles usó la misma estrategia para determinar si los cuartiles definidos por los valores de los constituyentes lagrimales muestran correlaciones similares con otras mediciones de los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco. Estos datos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de cuartiles para lisozima. Los valores del ensayo t, cuando son significativos (< 0,05), están resaltados en negrita.

Tabla 12

Lisozima		Valores medios							
	Medias	N	% de ojos	TFBUT	OSDI	Molestia ocular Ora Calibra	Inferior	Suma corneal	de Schirmer
Q1	0,00	55	27,78 %	5,78	13,66	1,18	1,13	2,48	19,65
Q4	1,07	10	52,53 %	6,56	14,77	1,25	1,41	3,18	15,38
Q1-Q4				-0,78	-1,11	-0,07	-0,29	-0,70	4,27
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,307	0,686	0,754	0,025	0,012	0,015

- 20 El cuartil de lisozima mostró una diferencia significativa para las medidas de tinción corneal, con tinción corneal inferior y total que muestra una correlación positiva con aumentos en los niveles de proteína de Q1 a Q4.

Discusión

El estudio actual ilustró la heterogeneidad de las dos poblaciones de sujetos incluidos originalmente para el análisis. A pesar de su inclusión basada en criterios diferenciales para la sintomatología, TFBUT, no se identificaron diferencias significativas entre las dos poblaciones en el análisis del constituyente lagrimal. Se observó una diferencia significativa para la tinción corneal y el ensayo de Schirmer.

Los aspectos de la descripción incluyen un método para medir el ojo seco, incluyendo el análisis de los constituyentes lagrimales. Los aspectos de la descripción incluyen un método para medir el ojo seco, incluyendo el análisis de los constituyentes lagrimales, y comparar el análisis de los constituyentes lagrimales con ensayos tales como, pero no limitado a, ensayo de Schirmer, TFBUT, etc., para obtener información para tratar a un paciente diagnosticado con enfermedad del ojo seco.

Los análisis de cuartiles muestran las relaciones entre las mediciones tradicionales y los parámetros ensayados que forman parte de los constituyentes lagrimales. Una excepción a esto es TFBUT, que muestra solo correlaciones modestas con cualquiera de los constituyentes lagrimales medidos. En contraste, las medidas de tinción corneal (tales como la tinción inferior, Tabla 11) están bien correlacionadas con los cambios en los parámetros ensayados. Esto es consistente con un diagnóstico de ojo seco evaporativo, donde una reducción en el contenido acuoso de las lágrimas produciría aumentos aparentes en las concentraciones de todos los constituyentes lagrimales. Alternativamente, los aumentos en las concentraciones de los constituyentes lagrimales pueden ser el resultado de una respuesta inflamatoria al estrés negativo de la superficie ocular que inicia un cambio en la relación de secreciones lagrimales graves a mucosas. Además, la lisozima se correlaciona con una tinción más alta y puntuaciones más bajas de Schirmer; sin embargo, la lisozima no muestra una correlación significativa con TFBUT.

Los aspectos de la descripción incluyen el uso de al menos un ensayo de diagnóstico. En algunos aspectos de la descripción, al realizar dicha comparación de constituyentes lagrimales en sujetos sanos y con ojo seco, se obtiene un efecto multiplicativo. En algunos aspectos de la descripción, se usa un kit para proporcionar una evaluación entre pacientes graves y sujetos sanos.

Ejemplo 3: Medición de mucina en muestras lagrimales

Se examinaron los niveles de un constituyente lagrimal prominente en sujetos sanos y en sujetos que cumplían uno o más criterios de ojo seco leve a moderado. Los siguientes experimentos ilustran una comparación entre los ensayos de referencia para la evaluación del ojo seco con una medida cuantitativa de un constituyente lagrimal. Los ejemplos de los ensayos usados para medir cuantitativamente al menos un constituyente lagrimal son la tinción corneal, los ensayos de Schirmer, TFBUT y la evaluación de los síntomas proporcionada incluyendo el cuestionario OSDI y la puntuación de molestia ocular Ora-Calibra™. El OSDI es una evaluación de 12 preguntas que se ha convertido en un estándar para la sintomatología del ojo seco. Las evaluaciones de malestar de Ora-Calibra también proporcionan una medición de la sintomatología al permitir que un paciente responda preguntas, donde el número de preguntas se reduce en comparación con el OSDI. Se recogieron muestras lagrimales usando tubos capilares y luego se analizaron para el constituyente lagrimal. El constituyente lagrimal medido fue mucina.

Ensayo de constituyente lagrimal y metodología de la medición

Se usaron tiras reactivas rápidas (tiras de análisis lagrimal) y reactivos para medir los niveles de lactoferrina usando una técnica semicuantitativa; donde la técnica semicuantitativa siguió un tiempo de ejecución fijo para cada tipo de ensayo, las tiras se escanearon con el modelo de escáner HP scanjet 200. La figura escaneada se optimizó usando la función Aclarar/Oscurecer: Destacados - (-) 50; Sombras - (-) 69; Medios tonos - (-) 50; Gamma-1,7 seguido por el registro de la intensidad de la señal (que se muestra en la Figura 5). La determinación del constituyente lagrimal se realizó usando una estimación semicuantitativa de las líneas de ensayo de intensidad en comparación con la intensidad de una serie de líneas control.

Diseño experimental

Población de sujetos: los sujetos para el estudio incluyeron a cualquier persona mayor de 18 años que cumpliera con los criterios de inclusión y exclusión enumerados en las siguientes tablas. La población de estudio incluyó dos grupos de sujetos (Grupo A, como se muestra en la Tabla 1 en el Ejemplo 1 anterior, y Grupo B, que se muestra en la Tabla 2 en el Ejemplo 1 anterior) con números aproximadamente iguales de cada uno (aproximadamente 100 sujetos por grupo):

Un método ejemplar fue un estudio prospectivo, de centro único, de visita única, de grupos paralelos, de recogida de datos y lágrimas, que consistió en aproximadamente 200 sujetos. Hubo una visita de estudio programada donde los sujetos fueron cribados; aquellos que cumplieron con los criterios de elegibilidad se incluyeron en el estudio.

Recogida de muestras lagrimales: el procedimiento para la recogida de muestras lagrimales se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Ensayo de mucina: el ensayo permite la detección de la mucina en lágrimas humanas mediante la detección de grupos

de azúcar de mucina (una glicoproteína, es decir, que contiene al menos un resto de azúcar) mediante un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. En primer lugar, se colocó una muestra lagrimal diluida en la almohadilla de muestra. Luego, se colocaron gotas adicionales de disolución de lavado en la almohadilla de muestra para permitir que la muestra lagrimal migrara y humedeciera la almohadilla de conjugado. La almohadilla de conjugado contenía una primera lectina (p. ej., jacalina) conjugada con partículas de oro a través de la interacción biotina-avidina. La lectina conjugada unió la mucina de la muestra lagrimal y migró a través de la membrana de nitrocelulosa hacia la mecha. Cuando los complejos de conjugado de oro/mucina alcanzaron la zona de ensayo, el conjugado de oro/mucina reacciona con una segunda lectina (aglutinina de germen de trigo ("WGA")) fijada a la superficie de la membrana (es decir, en la línea de ensayo). La acumulación del conjugado de oro/mucina unido a la línea de ensayo forma una línea visible de color rojo rosado. Luego, una cantidad en exceso de complejo migró a una segunda zona que contenía biotina BSA y se unió a un conjugado de estreptavidina oro, lo que formó una segunda línea (una línea control). La línea control indicó la validez del ensayo. Una cantidad residual de conjugado y muestra lagrimal migró desde la membrana de nitrocelulosa a la almohadilla de mecha.

La tira reactiva se produjo como sigue: 1 mg/ml (0,75-1,5 mg/ml) de WGA se impregnó en una membrana cromatográfica de nitrocelulosa (p. ej., papel de Whatman, FF120). La impregnación tiene la forma de una línea de 1 mm de ancho. La solución de lectina contiene adicionalmente lo siguiente: (1) tampón, p. ej., disolución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 o tampón Tris, HEPES, Bórax o MES con un valor de pH que varía entre 6,5-9,0; (2) trehalosa o sacarosa al 2 %, con una concentración que varía del 1 %-4 %; (3) etanol al 1-4 % (p. ej., pero no limitado a, etanol al 1 %, 2 %, 3 %, 4 %). La nitrocelulosa impregnada con WGA se secó a 50 grados C durante 10 minutos para unir la proteína a la nitrocelulosa. La unión de la WGA a la nitrocelulosa también puede ocurrir entre 37-60 grados C durante 5 a 24 horas, donde una temperatura más alta permitiría un tiempo de incubación más corto. La biotina se unió a jacalina mediante la conjugación de biotina con jacalina en una relación de, p. ej., pero no limitado a, 11:1, 22:1 o 33:1. La biotina-jacalina se unió al conjugado estreptavidina-oro en una relación de 5 µg/ml de biotina-jacalina y entre DO0,5/ml-DO2,0/ml, p. ej., pero no limitado a, DO1/ml, oro-estreptavidina. El complejo de reacción también puede incluir reactivo de lavado, que elimina el exceso de conjugados de oro de la membrana de nitrocelulosa. El reactivo de lavado puede contener lo siguiente: (1) PBS x 1 a pH 7,4 (puede variar de pH 7,0-9,0); (2) albúmina sérica bovina al 1 % libre de ácidos grasos (puede variar del 0,5 %-3,0 %); (3) Tween 20 al 0,1 % (puede variar del 0,05 %-2,0 %); o cualquier combinación de los mismos. Además, se puede añadir dodecilsulfato de sodio al 0,05 % al reactivo de lavado a una concentración del 0,01 %-1,0 %. Con respecto a la Figura 5, la intensidad de línea de 1 se forma cuando la mucina se mide a 12,5 µg/ml.

Ensayo del tiempo de ruptura de la película lagrimal: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Tinción de fluoresceína corneal: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Ensayo de Schirmer sin anestésico: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Escala de molestias oculares Ora Calibra™: el procedimiento se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Cuestionario de molestias oculares Ora Calibra™ y 4 síntomas: el cuestionario se realizó según el método descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Se siguieron los estándares de atención profesional para proteger la seguridad ocular de los sujetos con respecto al cumplimiento del régimen de estudio. Los sujetos que cumplieron con los criterios de entrada proporcionaron información demográfica, antecedentes médicos y oculares y uso de lágrimas artificiales, si es apropiado. El personal clínico confirmó que los sujetos no usaron lágrimas artificiales en la hora anterior al estudio, luego guio a los sujetos a través de los siguientes procedimientos:

1. Los sujetos completaron el cuestionario OSDI© y el cuestionario de molestias oculares Ora Calibra™ y de 4 síntomas.
2. Los sujetos y el personal revisaron los documentos fuente para confirmar que el sujeto cumplía con todos los criterios de inclusión/exclusión basados en los medicamentos actuales y el historial médico.
3. El personal clínico recogió 6-25 microlitros de lágrimas usando un capilar del ojo derecho del sujeto. El personal etiquetó el vial de recogida con el número de cribado del sujeto y vació el contenido del capilar en el vial.
4. En los casos en los que el volumen lagrimal recogido del ojo derecho era inferior a 6 microlitros, se extrajo una muestra del ojo izquierdo y el capilar se vació en otro vial limpio marcado con el mismo número de cribado del sujeto.
5. El personal clínico realizó un ensayo de tiempo de ruptura de la película lagrimal en el o los ojos de recogida.
6. El personal clínico realizó la tinción de fluoresceína corneal y examinó la superficie ocular del o de los ojos

de recogida.

7. Si se recogieron 6 o más microlitros del ojo derecho, pero el sujeto no cumplió con los criterios de inclusión de ruptura de la película lagrimal o tinción de fluoresceína en el ojo derecho, las etapas 3-6 se repitieron en el ojo izquierdo.
- 5 8. El personal clínico realizó el ensayo de Schirmer sin anestésicar en el o los ojos de recogida.
9. El personal clínico revisó los resultados para determinar si el paciente cumplía con todos los criterios de inclusión/exclusión en función de los datos recogidos según los puntos 3-8.
10. A los pacientes que cumplían con todos los criterios se les asignó un número de estudio sujeto y se clasificaron en la etiqueta según el diagnóstico de paciente sano o con sospecha de ojo seco.
- 10 11. Los eventos adversos, si es aplicable, fueron documentados.

Las muestras fueron manejadas y ensayadas usando los siguientes parámetros:

1. El volumen de las lágrimas recogidas se midió usando una micropipeta. Se añadió el doble del volumen medido con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) para una dilución final de 1:3.
- 15 2. Las lágrimas diluidas se diluyeron adicionalmente en serie a las siguientes diluciones: 1:50, 1:100 y 1:200 con PBS.
3. Se mezclaron dos microlitros de muestra diluida con 18 microlitros de mezcla de conjugado de oro en un microtubo. La tira reactiva relevante se sumergió en esa mezcla durante 4 minutos.
4. Se añadieron 25 microlitros adicionales de disolución de lavado al tubo para eliminar el exceso de colorante de la zona de reacción.
- 20 5. Después de 6 minutos, las tiras reactivas desarrolladas se secaron suavemente contra papel de seda y se escanearon con un escáner de escritorio.
6. La intensidad del ensayo se cuantificó según la escala de intensidad presentada en la Figura 5.

Análisis de potencia: la Tabla 13 presenta la potencia para tamaños de muestra seleccionados.

Tabla 13

Objetivo de rendimiento	Proporción de muestra	N	Potencia
0,55	0,70	95	0,82
	0,72	75	0,82
	0,75	50	0,84
0,60	0,70	100	0,55
	0,72	100	0,71
	0,75	90	0,84
0,65	0,70	100	0,16
	0,72	100	0,29
	0,75	100	0,55

25 La potencia se estimó usando el método exacto binomial, donde se tuvieron en cuenta dos puntos finales coprimarios (sensibilidad y especificidad), y donde "N" representa el número de casos positivos solamente (o negativos solamente). Por lo tanto, el tamaño total de la muestra se duplicó.

30 La Tabla 14 ilustra un parámetro de "Precisión", que se define como la mitad del intervalo de confianza (IC). El IC es una estimación de intervalo de un parámetro de población. El IC es un intervalo observado (es decir, se calcula a partir de las observaciones), en principio diferente de una muestra a otra, que con frecuencia incluye el parámetro de interés si el experimento se repite.

Tabla 14

Tamaño de la muestra	Número obtenido de respondedores	Tasa obtenida	IC inferior al 95 %	IC superior al 95 %	Precisión
80	48	60,0 %	48,4 %	70,8 %	11,2 %
	52	65,0 %	53,5 %	75,4 %	11,0 %
	56	70,0 %	58,7 %	79,8 %	10,6 %
	60	75,0 %	64,0 %	84,1 %	10,1 %
	64	80,0 %	69,5 %	88,2 %	9,4 %
	68	85,0 %	75,2 %	92,1 %	8,5 %
	72	90,0 %	81,2 %	95,6 %	7,2 %
	90				
90	54	60,0 %	49,1 %	70,2 %	10,6 %
	59	65,6 %	54,7 %	75,3 %	10,3 %
	63	70,0 %	59,4 %	79,3 %	10,0 %
	68	75,6 %	65,3 %	84,1 %	9,4 %
	72	80,0 %	70,2 %	87,7 %	8,8 %
	77	85,6 %	76,5 %	92,1 %	7,8 %
	81	90,0 %	81,8 %	95,4 %	6,8 %
	100				
100	60	60,0 %	49,7 %	69,7 %	10,0 %
	65	65,0 %	54,8 %	74,3 %	9,8 %
	70	70,0 %	60,0 %	78,8 %	9,4 %
	75	75,0 %	65,3 %	83,2 %	9,0 %
	80	80,0 %	70,8 %	87,4 %	8,3 %
	85	85,0 %	76,4 %	91,4 %	7,5 %
	90	90,0 %	82,3 %	95,1 %	6,4 %

Resultados y análisis

5 El resultado primario del estudio fue la comparación de ensayos de referencia para el ojo seco tales como TFBUT, tinción corneal, ensayo de Schirmer y cuestionarios OSDI con resultados de un ensayo de constituyentes de la película lagrimal (p. ej., mucina).

10 Todas las muestras recogidas obtenidas de los ojos de los pacientes que cumplieron con los criterios de entrada se incluyeron en los análisis. El objetivo del estudio fue desarrollar una herramienta de evaluación para comparar los ensayos de referencia para el ojo seco con un kit que ensaya el compuesto de la película lagrimal, la mucina. Los datos se distribuyeron de los valores menores a mayores y se compararon con otros parámetros para identificar correlaciones positivas y negativas. La Figura 5 ilustra la correlación de la intensidad de la línea de ensayo con la concentración de analito. En algunos aspectos de la descripción, una intensidad de línea de ensayo reducida se correlaciona con un ensayo para ojo seco (p. ej., ensayo de Schirmer, tinción corneal, OSDI, etc.).

15 En algunos aspectos de la descripción, la correlación de la línea de ensayo indica que una cantidad menor de mucina en un ensayo de prueba según algunos aspectos de la descripción, tal como, por ejemplo, 0 a 1 µg/ml se correlaciona con un resultado más bajo detectado por al menos un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de Schirmer, el ensayo de tinción corneal, OSDI y TFBUT.

20 El tamaño de la muestra en este estudio piloto (198 ojos en total, 99 por grupo) no se basó en ningún análisis de potencia, sino que se basó en una aproximación del número de ojos suficiente para construir un modelo para distinguir entre lágrimas sanas y con sospecha de ojo seco y evaluación de ensayos estándar de referencia con los diferentes parámetros ensayados.

25 Los eventos adversos (EA) incluyeron cualquier evento reportado en el transcurso de la recogida de lágrimas y los procedimientos de evaluación de la superficie ocular. Este estudio clínico incluyó TFBUT, tinción corneal y la recogida de lágrimas para el análisis de los constituyentes. Durante estos ensayos, el participante puede haber sentido una sensación de cuerpo extraño. Durante la recogida de lágrimas puede haber casos de contacto directo con el ojo debido al movimiento, lo que da lugar a abrasión corneal o enrojecimiento de los ojos. Cualquiera de dichos eventos se anotó y calificó de la siguiente manera:

Leve: Signo o síntoma, generalmente transitorio, que no requiere un tratamiento especial, que generalmente no interfiere con las actividades habituales.

Moderado: Signo o síntoma, que puede mejorarse con simples medidas terapéuticas; puede interferir con la actividad habitual.

Grave: Signo o síntoma que es intenso o debilitante y que interfiere con las actividades habituales. La recuperación generalmente fue asistida por medidas terapéuticas.

Un total de 198 sujetos completaron el estudio, incluyendo 126 mujeres y 72 hombres. El desglose de los sujetos según los criterios de ingreso A o B se describe en la Tabla 15 a continuación. Aquellos que cumplieron con los criterios de entrada no fueron emparejados por edad o género en este estudio.

Tabla 15

	Hombres	Mujeres	edad media
Grupo A Sano	41	59	45,5
Grupo B con sospecha de DE	31	67	58,6

5

Los sujetos incluidos en cada grupo de estudio cumplieron los criterios de entrada de ojo sano o con sospecha de ojo seco. El único criterio demográfico que mostró una diferencia significativa entre los dos grupos fue la edad; el análisis preliminar no mostró diferencias significativas en las mediciones lagrimales entre los dos grupos. Además, ambos grupos mostraron un rango de valores para los parámetros de ensayo de referencia. En base a esta observación, todos los sujetos se agruparon en un solo grupo y se analizaron usando cuartiles de población con la asunción de que la población muestreada representaba un continuo de gravedad del ojo seco. Usando este concepto, se clasificaron las mediciones para cada uno de los ensayos de referencia, y los valores medios para cada uno de los 4 cuartiles se compararon con las medidas para el diagnóstico lagrimal.

10

Análisis de cuartiles: el análisis de cuartiles para los ensayos de TFBUT, tinción inferior y de Schirmer se resumen en la Tabla 16. El enfoque de esta estrategia estaba en los extremos, los cuartiles 1 y 4, ya que representan a aquellos pacientes con las mayores diferencias para cada medición. En las tres medidas, Q1 fue el cuartil con valores esperados para pacientes normales y Q4 fue el cuartil con valores asociados con la enfermedad del ojo seco. Por ejemplo, aquellos en Q1 tienen un TFBUT medio de 12,80 segundos y, por lo tanto, se considerarían normales, mientras que aquellos en Q4 tienen un TFBUT medio de 2,34 segundos, lo que es consistente con un diagnóstico de enfermedad moderada del ojo seco. Cuando se compararon los valores medios para los parámetros ensayados en cada uno de los cuartiles definidos por TFBUT y/o tinción corneal, surgieron asociaciones entre la medición del tiempo de ruptura y la dinámica de los constituyentes lagrimales. La disminución de TFBUT entre Q1 y Q4 se acompaña de una disminución de mucina. Los cuartiles definidos por las puntuaciones de Schirmer muestran correlaciones negativas, p. ej., mientras que la puntuación media de Schirmer se reduce de Q1 a Q4, aumenta la cantidad de mucina. Los cuartiles definidos por mucina muestran una correlación significativa con las puntuaciones de tinción corneal, y también exhiben una correlación con las puntuaciones de síntomas OSDI y las puntuaciones de molestia ocular Ora Calibra. El aumento de los valores de mucina se correlaciona con mayores puntuaciones de síntomas, puntuaciones de tinción corneal más fuertes y puntuaciones de Schirmer reducidas.

15

20

25

La Tabla 16 muestra el análisis de cuartiles para TFBUT, tinción inferior y ensayo de Schirmer. Los valores del ensayo t, cuando son significativos (< 0,05), están resaltados en negrita.

30

Tabla 16

TFBUT				Valores medios
	Media	n	% de ojos	Mucina
Q1	12,80	48	24,6 %	0,579
Q4	2,34	48	24,6 %	0,443
Q4-Q1	-10,46			-0,135
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,103

Tinción inferior				
	Media	n	% de ojos	Mucina
Q1	0,42	52	27,5 %	0,351
Q4	2,25	59	31,2 %	0,646
Q4-Q1	1,83			0,295
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,003
Ensayo de Schirmer				
	Media	n	% de ojos	Mucina
Q1	32,44	52	26,40 %	0,466
Q4	5,21	52	26,40 %	0,624
Q4-Q1	-27,23			0,158
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,047

5 Una segunda ronda de análisis de cuartiles usó la misma estrategia para determinar si los cuartiles definidos por los valores de los constituyentes lagrimales muestran correlaciones similares con otras mediciones de los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco. Estos datos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Análisis de cuartiles para mucina. Los valores del ensayo t, cuando son significativos (< 0,05), están resaltados en negrita.

Tabla 17

Mucinas				Valores medios					
	Medias	N	% de ojos	TFBUT	OSDI	Molestia Ocular Ora Calibra	Inferior	Suma corneal	de Schirmer
Q1	0,07	53	26,77 %	5,30	11,26	0,98	1,08	2,45	19,68
Q4	0,93	78	39,39 %	6,55*	17,59	1,44	1,37	3,06	15,09
Q1-Q4				-1,25	-6,33	-0,45	-0,29	-0,62	4,59
Q1 frente a Q4, ensayo t				0,106	0,044	0,018	0,062	0,011	0,015

10 Los cuartiles asociados con la proteína mucina de la glándula lagrimal mostraron una diferencia significativa para las medidas de tinción corneal, con tinción corneal inferior y total y el ensayo de Schirmer mostrando una correlación positiva con aumentos en los niveles de proteína de Q1 a Q4.

Discusión

15 El estudio actual ilustró la heterogeneidad de las dos poblaciones de sujetos incluidos originalmente para el análisis. A pesar de su inclusión basada en criterios diferenciales para la sintomatología, TFBUT y tinción corneal inferior, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones en el análisis de los constituyentes lagrimales.

20 En algunos aspectos de la descripción, hay un método para medir el ojo seco, que incluye el análisis de constituyentes lagrimales. En algunos aspectos de la descripción, hay un método para medir el ojo seco, que incluye el análisis de los constituyentes lagrimales y la comparación del análisis de los constituyentes lagrimales con ensayos tales como, pero no limitado a, el ensayo de Schirmer, TFBUT, etc., para obtener información para tratar a un paciente diagnosticado con enfermedad del ojo seco.

25 Los análisis de cuartiles muestran las relaciones entre las mediciones tradicionales y los parámetros ensayados que forman parte de los constituyentes lagrimales. Una excepción a esto es TFBUT, que muestra solo correlaciones modestas con cualquiera de los constituyentes lagrimales medidos. En contraste, las medidas de tinción corneal (tal como la tinción inferior, Tabla 16) están bien correlacionadas con cambios en los parámetros ensayados. Esto es consistente con un diagnóstico de ojo seco evaporativo, donde una reducción en el contenido acuoso de las lágrimas produciría aumentos aparentes en las concentraciones de todos los constituyentes lagrimales. Alternativamente, los aumentos en las concentraciones de constituyentes lagrimales pueden ser el resultado de una respuesta inflamatoria

al estrés negativo de la superficie ocular que inicia un cambio en la relación de secreciones lagrimales graves a mucosas.

5 En algunos aspectos de la descripción, el método incluye el uso de al menos un ensayo de diagnóstico. En algunos aspectos de la descripción, al realizar dicha comparación de constituyentes lagrimales en sujetos sanos y con ojo seco, se obtiene un efecto multiplicativo. En algunos aspectos de la descripción, se usa un kit para proporcionar una evaluación entre pacientes graves y sujetos sanos.

Ejemplo 4: Medición de múltiples constituyentes de muestras lagrimales

10 Una estrategia para desarrollar diagnósticos más fiables para DES es un examen comparativo de constituyentes lagrimales prominentes en sujetos sanos y en sujetos con DES. Se midieron múltiples componentes lagrimales con el objetivo de determinar qué medidas o combinación de medidas podrían mostrar correlaciones fiables con las medidas establecidas de DES y, por lo tanto, representan la base para una nueva modalidad de diagnóstico. Al realizar esta comparación de los constituyentes lagrimales en pacientes sanos y con DES, se observó que una combinación de ensayos podría proporcionar un potencial para un efecto diagnóstico multiplicativo.

15 En el estudio descrito en este Ejemplo, los sujetos se sometieron a ensayos de referencia de uso común que incluyen tinción corneal, ensayos de Schirmer, TFBUT y evaluaciones de síntomas usando el cuestionario OSDI. Estos ensayos de referencia se usaron para calificar la gravedad de la enfermedad de cada sujeto según una matriz de puntuación establecida usada en procesos de aprobación reguladores anteriores de la FDA para otros productos de diagnóstico del síndrome del ojo seco. Las muestras lagrimales recogidas de cada sujeto se analizaron usando ensayos para 5 constituyentes lagrimales con el objetivo de distinguir entre lágrimas de sujetos sanos y lágrimas de sujetos con síndrome de ojo seco. Las muestras lagrimales se sometieron a análisis cuantitativos para lisozima, lactoferrina, metaloproteínasa de matriz 9, albúmina y mucina, cada una de ellas puntuada en una escala ordinal de 0,1 a 2, con incrementos de 0,25. Los resultados del ensayo fueron leídos por dos lectores independientes como control interno; en más del 98 % de los casos, la diferencia entre los lectores fue insignificante.

25 El objetivo de este estudio descrito en este Ejemplo fue evaluar la efectividad de los ensayos desarrollados en lágrimas de sujetos sanos, así como de sujetos con ojo seco, en base a las definiciones de la FDA que se usaron en procesos de aprobación reguladores anteriores de la FDA para otros productos para el síndrome del ojo seco (véanse los criterios de inclusión y exclusión a continuación).

30 Este fue un estudio prospectivo, de centro único, visita única, grupo paralelo, de recogida de datos y lágrimas. Hubo una visita de estudio programada donde los sujetos fueron cribados y si cumplían con los criterios de elegibilidad se incluyeron en el estudio. Los documentos fuente sirvieron como CRF para los datos del estudio recogidos. No hubo ningún artículo de ensayo en este estudio.

35 Se obtuvo el consentimiento informado por escrito del sujeto antes de iniciar cualquier procedimiento especificado por este protocolo, incluidos los procedimientos de cribado. Los formularios de consentimiento informado firmados originales se mantuvieron con los registros de los sujetos para todos los sujetos. Se siguieron los estándares de atención profesional para proteger la seguridad ocular de los sujetos con respecto al cumplimiento del régimen de estudio.

Selección de la población de estudio

La población de estudio se dividió en dos grupos:

- Grupo A: sujetos con ojos sanos (control; aproximadamente 30 sujetos)
- 40 Grupo B: sujetos con síndrome de ojo seco (grados 1-4; aproximadamente 40 sujetos).

Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión: para ser elegibles para la inclusión, los sujetos tenían que:

1. Tener al menos 30 años de edad y puede ser de cualquier raza y género;
- 45 2. Poder leer, firmar y fechar el consentimiento informado aprobado por el IRB. Además, el consentimiento informado debe ser firmado y fechado por la persona que da su consentimiento al sujeto;
3. Estar de acuerdo en permitir que se recojan muestras lagrimales de ambos ojos;
4. Estar dispuesto a seguir los procedimientos del estudio y la programación de las visitas;
5. Cumplir con los criterios de grado de severidad aplicables de Control negativo, Grado 1, Grado 2 o Grado 3-4;

Exclusión: los sujetos fueron excluidos si:

1. El sujeto tenía alergia al anestésico tópico o al tinte de fluoresceína;
2. El sujeto tenía antecedentes de lesiones oculares, traumatismos o cirugía ocular en los últimos 3 meses;
3. El sujeto tenía un bloqueo conocido del sistema de drenaje lagrimal;
- 5 4. El sujeto estaba siendo tratado médicamente para un síndrome ocular crónico, tal como glaucoma, alergia o conjuntivitis;
5. El sujeto tenía una afección que, en opinión del Investigador Principal, interferiría con una participación óptima en el estudio, o que presentaría un riesgo especial para el sujeto;
6. El sujeto había usado lentes de contacto en los últimos 7 días;
- 10 7. El sujeto usó un medicamento de estudio en investigación o un dispositivo de estudio en los 30 días de la inclusión;
8. El sujeto tuvo una cirugía refractiva corneal previa que incluyó cirugía RK, LASIK o PRK;
9. El sujeto tenía inflamación intraocular activa actual o antecedentes de inflamación intraocular, p. ej., uveítis.
10. El sujeto había usado doxiciclina oral, corticosteroides o inmunomoduladores en los últimos 30 días;
- 15 11. El sujeto había recibido corticosteroides oculares tópicos, terapia no esteroidea ocular tópica (AINE) o ciclosporina ocular tópica en los últimos 30 días;
12. El sujeto era una mujer que estaba embarazada o amamantando;
13. El sujeto había usado cualquier medicamento oftálmico tópico, excluyendo lágrimas artificiales, en los 14 días previos a la recogida de lágrimas; o
- 20 14. El sujeto había usado lágrimas artificiales en las 24 horas a la recogida de lágrimas.

Procedimientos del estudio

Esquema de clasificación de la gravedad: el método de clasificación usado para calificar a los sujetos control y con ojo seco se basó en el siguiente esquema de clasificación:

Tabla 18 - Clasificación del ojo seco

Ensayo clínico	Negativo	Leve	Moderado	Moderado/Grave	Grave
	Control	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Puntuación OSDI	≤ 13	≥ 13	≥ 13	≥ 13	≥ 13
TFBUT (seg)	> 10	< 10	≤ 10	≤ 5	0 ^a
Schimer (mm/5 min)	> 10	< 10	≤ 10	≤ 5	≤ 2
Tinción (escala 0-5)	0	0	1-2	3	≥ 4

25

Inclusión objetivo del estudio: la inclusión por calificaciones de sujetos fue la siguiente:

Control negativo:	Aproximadamente 30 sujetos
Grado 1:	Aproximadamente 5 sujetos
Grado 2:	Aproximadamente 5 sujetos
Grado 3-4:	Aproximadamente 30 sujetos

Visitas y exámenes: Visita 1 (línea base y recogida de lágrimas):

- 30 1. Obtener información demográfica, antecedentes médicos y oculares y uso de lágrimas artificiales, si es apropiado.
2. Instruir al sujeto para completar el cuestionario OSDI© y el cuestionario de molestia ocular Ora Calibra™ y 4 síntomas.

3. Realizar agudeza visual.
4. Realizar examen con lámpara de hendidura.
5. Realizar la evaluación de la glándula de Meibomia en ambos ojos.
6. Recoger 6-25 microlitros de lágrimas usando un capilar del ojo derecho del sujeto.
- 5 7. Realizar el ensayo de tiempo de ruptura de la película lagrimal en el o los de recogida.
8. Realizar tinción con fluoresceína corneal y examinar la superficie ocular en el o los ojos de recogida.
9. Realizar el ensayo de Schirmer sin anestesiarse en el o los ojos de recogida.
10. Asignar el número de estudio del sujeto, registrar en la etiqueta según el grado de diagnóstico.
11. Documentar cualquier evento adverso, si es aplicable.

10 Procedimientos de la visita 2: si no se pudieron analizar las lágrimas de la Visita 1 de un sujeto (p. ej., volumen insuficiente), se pidió a los sujetos que regresaran para una segunda visita para recoger las lágrimas.

1. Realizar agudeza visual.
2. Realizar examen con lámpara de hendidura.
3. Recoger de 6-25 microlitros de lágrimas usando un capilar del o de los ojos calificados del sujeto.

15 *Análisis y variables de seguridad*

Mediciones lagrimales: las medidas de suma de lágrimas de lisozima, lactoferrina, metaloproteinasa de matriz 9, albúmina y mucina se analizaron como variables explicativas calificadas en una escala de intensidad de línea visual de 0,1 a 2 con incrementos de 0,25 en una regresión logística para determinar la asociación con sujetos con ojo seco de grado 1-4 o sujetos sanos.

20 Los componentes lagrimales se analizaron de forma monofactorial para su asociación con el ojo seco. Se usó un procedimiento de selección directa donde después de colocar la variable explicativa inicial en el modelo, se colocarían entonces en el modelo términos de efectos principales adicionales (que fueron significativos dentro de un análisis monofactorial en un alfa de 2 lados = 0,10), así como los términos de interacción bidireccionales correspondientes con los otros efectos principales que ya estaban en el modelo, los términos se añadieron y se mantuvieron en un alfa de 2
25 lados = 0,05. Si un término de interacción cumplía con los criterios para ser añadido, entonces también se añadió el término de efecto principal.

Evaluaciones de ojo seco: los sujetos fueron cribados para detectar signos y síntomas del síndrome del ojo seco como se describió anteriormente.

Tabla 19 Datos demográficos de los sujetos incluidos

	Sujetos con ojo seco				
	Sujetos sanos	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
<i>Total</i>	30	5	5	33	1
<i>% no blanco</i>	10	0	0	0	0
<i>% de mujeres</i>	50	100	80	75,6	0
<i>Edad, rango</i>	31-80	44-63	64-80	39-79	68
<i>Edad, media ± SD</i>	48,5 ± 11,4	51,2 ± 7,6	71,4 ± 5,9	61,1 ± 9,3	-

30 *Resultados*

Un total de 74 sujetos completaron el estudio, incluyendo 5 cada uno clasificado como ojo seco de Grado 1 o Grado 2, 34 sujetos con un Grado de 3 o 4, y 30 controles sanos. Los datos demográficos se resumen en la Tabla 5-2. Los sujetos con síndrome de ojo seco tenían más probabilidades de ser mujeres (34/44 para sujetos de grado 3/4 frente a
35 15/30 para los controles) y más probabilidades de ser más mayores.

Resultados de los cribados iniciales: los resultados del análisis de los constituyentes lagrimales mostraron que en un análisis monofactorial de Wald Chi-cuadrado para cada uno, solo la albúmina mostró una correlación significativa (P menor de 0,05) con puntuaciones sumadas de ojo seco (P = 0,0370).

Modelado de resultados del análisis lagrimal: se incluyó un total de 74 sujetos, 44 con ojo seco de grado 1-4 y 30 sanos, en el desarrollo de modelos predictivos. Como una primera etapa en este proceso, se construyó un algoritmo predictivo basado en las medidas de albúmina. El modelo con albúmina sola es:

Tabla 20: Modelo 0 - Albúmina sola

	DF	Estimación estándar	Error	Wald Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
Intersección	1	-0,6491	0,5421	1,4338	0,2311
Albúmina	1	1,1142	0,5342	4,3506	0,0370

5 Usando estos términos, la probabilidad de ser un sujeto con ojo seco (Grado 1-4) dada la puntuación de albúmina lagrimal se calcula como:

$$\frac{\exp(-0,6491 - 1,1142 * \text{Albúmina})}{1 + \exp(-0,6491 - 1,1142 * \text{Albúmina})}$$

10 Después de calcular esta probabilidad, un sujeto fue asignado a un grupo (ojo seco o sano) en función de la probabilidad. Usando una probabilidad de corte del 50 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tenían ojo seco 34/44 = 77,4 % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos 9/30 = 30,0 % del tiempo.

15 Después de aumentar la probabilidad de corte al 60 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tenían ojo seco 30/44 = 68,2 % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos 19/30 = 63,3 % del tiempo.

20 En un modelo combinado, todas las variables se ingresaron en el modelo junto con cada interacción bidireccional; se implementó un procedimiento de selección inversa para eliminar los términos que no eran significativos en un alfa de 2 lados = 0,10. Si un término de interacción cumplía con los criterios para ser añadido, entonces también se requerían los términos del efecto principal. Como el número de sujetos hispanos/latinos era pequeño, el ajuste del modelo estaba en cuestión, incluyendo la etnicidad en el modelo. Por lo tanto, se eliminó la etnicidad y todas las interacciones bidireccionales de la misma.

El modelo resultante rindió albúmina, lactoferrina, edad, género y albúmina*lactoferrina como variables explicativas significativas y tiene las siguientes estimaciones de probabilidad máxima para estimar las probabilidades logarítmicas de que el sujeto sea un sujeto de ojo seco de grado 3/4:

25 **Tabla 21: modelo 1 - Albúmina / Lactoferrina + Datos demográficos**

	DF	Estimación Estándar	Error	Wald Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
Intersección	1	-4,4755	2,2037	4,1247	0,0423
Lactoferrina	1	-10,2477	4,8174	4,5250	0,0334
Albúmina	1	-1,9616	1,4646	1,7938	0,1805
Edad	1	0,1263	0,0374	11,376	0,0007
género (F)	1	1,0347	0,3566	8,4180	0,003 7
Lactoferrina* Albúmina	1	8,7859	4,7024	3,4909	0,0617

Con base en este modelo, la probabilidad de ser un sujeto con ojo seco (G1-4) dadas las puntuaciones de albúmina, lactoferrina, edad y género se calcula con la siguiente expresión:

$$\frac{\exp(-5,7198 - 3,9059 * \text{Albúmina} - 0,7375 * \text{Lisozima} - 2,7929 * \text{Lactoferrina} + 0,1507 * \text{Edad (años)} + 1,2206 * (-1 \text{ si es hombre}) + 7,1682 * \text{Albúmina} * \text{Lactoferrina} + 4,4090 * \text{Albúmina} * \text{Lisozima} - 10,7566 * \text{Lisozima} * \text{Lactoferrina})}{1 + \exp(-5,7198 - 3,9059 * \text{Albúmina} - 0,7375 * \text{Lisozima} - 2,7929 * \text{Lactoferrina} + 0,1507 * \text{Edad (años)} + 1,2206 * (-1 \text{ si es hombre}) + 7,1682 * \text{Albúmina} * \text{Lactoferrina} + 4,4090 * \text{Albúmina} * \text{Lisozima} - 10,7566 * \text{Lisozima} * \text{Lactoferrina})}$$

30 Después de calcular esta probabilidad, se asignó un sujeto a un grupo (ojo seco o sano) en función de la probabilidad. Usando una probabilidad de corte del 50 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tienen ojo seco 39/44 = 88,6 % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos 23/30 = 76,7 % del tiempo.

Después de aumentar la probabilidad de corte al 55 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tienen ojo seco $37/44 = 84,1$ % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos $24/30 = 80,0$ % del tiempo.

5 Al aumentar aún más la probabilidad de corte al 60 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tienen ojo seco $36/44 = 81,8$ % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos $26/30 = 86,7$ % del tiempo.

Los resultados de este modelo demostraron que elegir una probabilidad de corte del 55 % o el 60 % rinde una sensibilidad y especificidad mayores de o iguales al 80 %.

10 La adición de lisozima sola al Modelo 1 no rindió diferencias en la sensibilidad o especificidad del modelo. En contraste, la adición de términos de interacción Lisozima*Albúmina y Lisozima*Lactoferrina rindió una potencia predictiva adicional debido a los términos de interacción, por lo que se construyó un segundo modelo que combina todos estos términos.

Tabla 22: Modelo 2 - Albúmina/ Lisozima/ Lactoferrina/ Datos demográficos

	DF	Estimación estándar	Error	Wald cuadrado	Chi- Pr > ChiSq
Intersección	1	-5,7198	2,9654	3,7204	0,0538
Albúmina	1	-3,9059	2,0031	3,8022	0,0512
Lisozima	1	-0,7375	3,1381	0,0552	0,8142
Lactoferrina	1	-2,7929	5,1812	0,2906	0,5899
Edad	1	0,1507	0,0440	11,7043	0,0006
género (F)	1	1,2206	0,4076	8,9656	0,0028
Albúmina*Lactoferrina	1	7,1682	4,4899	2,5488	0,1104
Albúmina*Lisozima	1	4,4090	2,9299	2,2644	0,1324
Lisozima*Lactoferrina	1	10,7566	7,2803	2,1830	0,1395

15 Usando una probabilidad de corte del 50 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tienen ojo seco $40/44 = 90,9$ % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos $23/30 = 76,7$ % del tiempo.

20 Después de aumentar la probabilidad de corte al 55 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tienen ojo seco $38/44 = 86,4$ % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos $26/30 = 86,7$ % del tiempo.

Al aumentar aún más la probabilidad de corte al 60 %, el modelo clasificó correctamente a los sujetos con ojo seco como que tienen ojo seco $36/44 = 81,8$ % del tiempo y clasificó correctamente a los sujetos sanos como sanos $27/30 = 90,0$ % del tiempo.

25 La adición de lisozima y las interacciones de lisozima*albúmina y lisozima*lactoferrina mejora ligeramente la sensibilidad y la especificidad en cada probabilidad de corte.

No se reportaron eventos adversos o problemas de seguridad en el transcurso del estudio.

Discusión y conclusión general

30 El propósito del resumen del estudio en este Ejemplo fue evaluar la efectividad de los métodos en lágrimas de sujetos sanos, así como de sujetos con síndrome de ojo seco. En primer lugar, se usó un sistema de clasificación estandarizado para definir y distinguir a las poblaciones de sujetos sanos de aquellas con diferentes grados de síndrome de ojo seco. Este esquema de calificación fue una composición de cuatro ensayos de referencia establecidos para la evaluación de los signos y síntomas del ojo seco. Esta definición se ha usado previamente en el ensayo clínico regulador de EE. UU. y en un proceso de aprobación de la FDA de un ensayo de cribado de ojo seco en el consultorio llamado InflammDry®, un ensayo basado en la detección de niveles lagrimales de MMP9.

35 Los sujetos de estudio calificados usando el sistema estandarizado también se ensayaron para determinar un panel de constituyentes lagrimales seleccionados en función de su potencial para proporcionar una medida objetiva de la gravedad del ojo seco. Las intensidades de línea observadas y los datos demográficos de los sujetos se usaron para construir modelos estadísticos predictivos como un medio para juzgar qué ensayos desarrollados podrían proporcionar la mejor potencia de diagnóstico.

Los resultados de los ensayos desarrollados sugirieron que la albúmina era el mejor ensayo sobre el cual basar un modelo predictivo, ya que mostraba la mayor efectividad para identificar sujetos con DES. Sin embargo, la inclusión de ensayos adicionales proporciona la oportunidad de una sensibilidad y especificidad aún mayores. Por esta razón, y debido al hecho de que sabemos que el DES es un síndrome multifactorial, realizamos todos nuestros ensayos y luego los combinamos en un modelo para hacer la pregunta, dada la puntuación de los constituyentes lagrimales de cada sujeto, de cómo de sensible y cómo de específica puede ser una combinación de estos constituyentes en términos de su capacidad para diagnosticar DES.

La sensibilidad del ensayo representa el número de sujetos identificados correctamente como que tienen DES, mientras que la especificidad representa el número de sujetos identificados correctamente como controles sanos. Estos valores se pueden combinar en el valor predictivo positivo (PPV), una medida de qué fracción de los sujetos identificados como pacientes con DES tienen ojo seco. Un ensayo ideal tendría tanto una alta sensibilidad como una alta especificidad. La Tabla 23 presenta una comparación de la sensibilidad y especificidad de los diferentes modelos, basada en los resultados de los diferentes ensayos.

En cuanto a hoy, hay dos ensayos comerciales de diagnóstico de DES principales en el mercado, ambos relacionados con la heterogeneidad de la población de pacientes y que se basan en un solo parámetro y tratan de diagnosticar la enfermedad multifactorial - el InflammDry®, un diagnóstico de punto de uso que proporciona un ensayo positivo o negativo para el marcador inflamatorio MMP914 y el sistema TearLab® que proporciona un resultado numérico de osmolaridad lagrimal en un rango entre 302 y 328 mOsm, un rango que incluye tanto valores normales como hiperosmolares. El dispositivo InflammDry® y el sistema de osmolaridad TearLab® ofrecen ensayos de diagnóstico objetivos diseñados para su uso en el marco de una consulta ambulatoria; ambos obtuvieron buenos resultados en ensayos clínicos patrocinados.

Tabla 23: Comparación de modelos

MODELO	PROBABILIDAD DE CORTE	SUJETOS CON OJO SECO	SUJETOS SANOS	VALOR PREDICTIVO POSITIVO
		<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	
MODELO 0	50 %	77,4 %	30 %	72,1 %
albúmina	60 %	68,2 %	63,3 %	65 %
MODELO 1	50 %	88,6 %	76,7 %	79,6 %
albúmina/lactoferrina	55 %	84,1 %	80 %	80,8 %
+ datos demográficos	60 %	81,8 %	86,7 %	86 %
MODELO 2	50 %	90,9 %	76,7 %	78,8 %
albúmina/ lisozima/ lactoferrina/ datos demográficos	55 %	86,4 %	86,7 %	86,7 %
	60 %	81,8 %	90 %	89,1 %

Los valores de sensibilidad y especificidad del Modelo 2 (Tabla 7-1) están en línea con los diagnósticos comerciales, incluyendo el sistema de osmolaridad TearLab® o InflammDry® (Tabla 24). Este resultado respalda el uso potencial de los ensayos combinados del Modelo 2 como diagnóstico para el ojo seco. De particular interés, el esquema de clasificación para los estudios de InflammDry® usa el mismo conjunto de criterios de diagnóstico para el ojo seco empleado en este estudio¹⁴, una variable importante en las comparaciones de diferentes resultados del ensayo.

Los resultados del estudio también muestran que el Modelo 2 es capaz de diagnosticar el ojo seco con una sensibilidad y especificidad superiores también respecto a los ensayos existentes bien establecidas, en particular, los ensayos que normalmente se realizarían en el marco del consultorio del médico: ensayo de Schirmer, TFBUT, cuestionarios sintomáticos (tales como ODSI) o tinción corneal.

Tabla 24: Características de otros ensayos de ojo seco

ENSAYO(S)	SUJETOS CON OJO SECO	SUJETOS SANOS
	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>
ENSAYO DE SCHIRMER	42 %	76 %
TIEMPO DE RUPTURA DE LA PELÍCULA LAGRIMAL	92 %	17 %
TINCIÓN CORNEAL	63 %	89 %
CUESTIONARIO	89 %	72 %

INFLAMMADRY® (MMP9)	66-97 %	97-98 %
TEARLAB® (OSMOLARIDAD) ¹⁷⁻¹⁹	64-73 %	71-92 %

5 Aunque los dispositivos InflammDry® y TearLab® han demostrado buena sensibilidad y especificidad en algunos ensayos, en ambos casos se debate acerca de su fiabilidad general como diagnóstico, principalmente debido al hecho de que ambos ensayos están relacionados con la heterogeneidad de la población de pacientes y se basan en un solo parámetro tratando de diagnosticar la enfermedad multifactorial. Por ejemplo, varios estudios recientes han concluido que no había correlación entre las medidas de osmolaridad basadas en TearLab® y otros signos o síntomas de ojo seco. Del mismo modo, mientras que las evaluaciones iniciales de InflammDry® lo calificaron con una alta sensibilidad y especificidad, estudios más recientes encontraron poca o ninguna correlación con los resultados del dispositivo de detección de MMP9 y otros ensayos de ojo seco. Esta diferencia puede atribuirse a las diferencias en los métodos de recogida de muestras.

10 Tanto el sistema TearLab® como el estudio actual recogen el fluido lagrimal suavemente del aspecto lateral del ojo. En contraste, el muestreo de InflammDry® implica un roce relativamente agresivo del párpado inferior. La comparación directa de los niveles de MMP9 usando los dos métodos de recogida podría ser necesaria para resolver la base de la diferencia en los hallazgos de MMP9.

15 Como un ensayo adicional de los modelos derivados de este estudio, se ensayó un conjunto de datos del primer ensayo clínico DiagnosTear, que incluía pacientes que se sospechaba que eran sanos y con DES (reclutados según diferentes criterios de inclusión) usando el Modelo 2; los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25: Modelos de ensayo en los resultados del primer ensayo clínico

MODELO	SUJETOS CON SUJETOS SANOS		
	PROBABILIDAD DE CORTE OJO SECO	Sensibilidad	Especificidad
	50 %	73,5 %	63 %
MODELO 2 Resultados usando datos del primer ensayo clínico	55 %	70,4 %	65 %
	60 %	67,4 %	67 %

20 Puede ser valioso ensayar poblaciones más grandes u otros esquemas de clasificación de ojo seco como un ensayo de los modelos desarrollados en este estudio. Por ejemplo, un esquema de clasificación que incluye un componente de tinción conjuntival se ha usado en estudios recientes de proteómica de proteínas lagrimales. Además, el tamaño de la muestra usado para el estudio puede introducir un sesgo debido a las diferencias de edad y género en los grupos de sujetos, pero este es un problema que puede abordarse en futuros ensayos.

25 La inflamación es un factor conocido en la etiología del ojo seco, y los tejidos expuestos a señales proinflamatorias responden con aumentos en la permeabilidad vascular y pérdida de fluido exudativo de la vasculatura local. Dicho exudado puede afectar la composición de la película lagrimal con una mayor concentración de electrolitos (es decir, una mayor osmolaridad) y un aumento en la concentración de albúmina. Por lo tanto, los marcadores usados en este estudio permiten una medida integrada de varias secuelas del fenotipo del ojo seco.

30 El uso de la albúmina como diagnóstico tiene una sólida base científica. La albúmina se difunde desde los vasos conjuntivales dilatados hacia la película lagrimal, cuya concentración aumenta durante el cierre de los ojos y las heridas. Los niveles lagrimales de albúmina, por lo tanto, pueden considerarse un marcador de la integridad de la superficie ocular. Además, una de las respuestas distintivas en cualquier evento inflamatorio es un aumento en la permeabilidad vascular, y con ese aumento es razonable esperar un aumento en el flujo de componentes solubles en el plasma circulante (donde las concentraciones de albúmina varían entre el 3 y el 5 %) desde la vasculatura hacia la película lagrimal. Los resultados de este ensayo (y otros estudios) confirman que los cambios significativos en la albúmina de la película lagrimal se correlacionan con el ojo seco.

35 No hay reportes hasta la fecha que demuestren un papel fisiológico claro para la albúmina en las lágrimas. A pesar de esto, los estudios preclínicos de inflamación ocular llevaron a Shimura et al (2003) a sugerir que la albúmina en la película lagrimal podría representar una respuesta compensatoria a las reducciones en las mucinas solubles después de lagrimeo reducido o una pérdida de células caliciformes. El estudio mostró que la albúmina parece disminuir la apoptosis de las células epiteliales en ratas, lo que sugiere un papel activo para la proteína derivada del suero en respuesta a la inflamación ocular. También sugirieron que la albúmina lagrimal era un marcador específico de la integridad de la superficie ocular, un concepto respaldado por los hallazgos del primer estudio clínico de DiagnosTear en el que se observó una correlación positiva significativa entre la albúmina y la tinción corneal.

45 Los resultados derivados de la albúmina sola (Modelo 0) son menos robustos que los que emplean múltiples ensayos, pero pueden beneficiarse de la simplicidad de medir solo un único componente lagrimal, donde se minimiza el potencial

de problemas de interferencia del procedimiento o los ensayos. Por el contrario, también puede valer la pena examinar la potencia diagnóstica de los modelos de ensayos múltiples en sujetos con puntuaciones bajas en encuestas OSDI que son asintomáticos, pero cumplen con los criterios del ojo seco basados en la tinción y otros ensayos tradicionales de ojo seco. Estos sujetos tienen un riesgo particular de daño en la superficie ocular debido a sus bajos niveles de molestias.

5
10 Se ha establecido un papel potencial de la lisozima y la lactoferrina en el ojo seco durante algún tiempo, ya que se son productos de las glándulas lagrimales conocidos y dos de los componentes principales de la fase acuosa sana de la película lagrimal. Los niveles de estas proteínas representan una medida de la producción de la glándula lagrimal, por lo que cualquier alteración en sus concentraciones en la película lagrimal implicaría una disfunción de la glándula lagrimal. Otros marcadores en las lágrimas incluyen productos inflamatorios tales como MMP9; dichos marcadores lagrimales reflejan la infiltración perilagrimal local de las células inflamatorias.

15 Hasta donde sabemos, demostramos, por primera vez, que la combinación de niveles de proteínas originadas en diferentes lugares del ojo tiene una capacidad significativa para diagnosticar DES. Un ensayo que combina cambios en uno o más de estos dos constituyentes lagrimales con albúmina estará muestreando dos respuestas fisiológicas distintas al desafío de la superficie ocular y, por lo tanto, puede proporcionar un resultado de diagnóstico más robusto.

Los resultados de este estudio confirman que una estrategia de múltiples ensayos probablemente proporcione la mejor herramienta de diagnóstico para usar en la identificación y el tratamiento del síndrome del ojo seco.

20 Se examinaron los niveles de un constituyente lagrimal prominente en sujetos sanos y en sujetos que cumplían uno o más criterios de ojo seco leve a moderado. Los siguientes experimentos ilustran una comparación entre los ensayos de referencia para la evaluación del ojo seco con una medida cuantitativa de un constituyente lagrimal. Los ejemplos de los ensayos usados para medir cuantitativamente al menos un constituyente lagrimal son la tinción corneal, los ensayos de Schirmer, TFBUT y la evaluación de los síntomas proporcionados incluyendo el cuestionario OSDI y la puntuación de molestia ocular Ora-Calibra™. El OSDI es una evaluación de 12 preguntas que se ha convertido en un estándar para la sintomatología del ojo seco. Las evaluaciones de malestar de Ora-Calibra también proporcionan una
25 medición de la sintomatología al permitir que un paciente responda preguntas, donde el número de preguntas se reduce en comparación con el OSDI. Se recogieron muestras de lágrimas usando tubos capilares y luego se sometieron a análisis para el constituyente lagrimal. El constituyente lagrimal medido fue mucina.

REIVINDICACIONES

1. Un método, en sonde el método clasifica a un sujeto como que padece ojo seco, consistiendo el método en:

- a. obtener una muestra lagrimal del paciente y determinar el nivel de albúmina sérica humana;
- 5 b. a partir del nivel determinado de albúmina sérica humana, asignar una puntuación para la cantidad determinada de albúmina sérica humana; y
- c. a partir de la puntuación asignada, calcular una puntuación de probabilidad de corte, según la siguiente ecuación:

$$\frac{\exp(-0,6491 - 1,1142 * \text{Albúmina})}{1 + \exp(-0,6491 - 1,1142 * \text{Albúmina})}$$

en donde el sujeto tiene ojo seco, si la puntuación de probabilidad de corte calculada es del 50 % al 60 %.

10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 50 %, y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 77 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 30 % del tiempo.

15 3. El método de la reivindicación 1, en el que el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 60 %, y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 68 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 63 % del tiempo.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinar el nivel de albúmina sérica humana en la muestra lagrimal, se lleva a cabo usando un dispositivo, comprendiendo el dispositivo:

- a. una tira reactiva configurada para recibir una muestra lagrimal del paciente; y
- 20 b. una almohadilla de reactivo, que contiene reactivos específicos para la albúmina sérica humana, que, al entrar en contacto con la muestra lagrimal, experimenta una reacción configurada para producir un color, en donde la intensidad del color es proporcional a la cantidad de albúmina sérica humana en la muestra lagrimal, y en donde la tira reactiva está configurada para suministrar la muestra lagrimal a la almohadilla de reactivo.

25 5. El método de una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de obtener datos demográficos, que consisten en la edad y el género del sujeto.

6. Un método, en donde el método clasifica a un sujeto como que padece ojo seco, consistiendo el método en:

- a. obtener datos demográficos, que consisten en la edad y el género del sujeto;
- b. obtener una muestra lagrimal del paciente y determinar el nivel de albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima;
- 30 c. a partir del nivel determinado de albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima, asignar una puntuación para la cantidad determinada de albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima; y
- d. a partir de la puntuación asignada, calcular una puntuación de probabilidad de corte, según la siguiente ecuación:

$$\frac{\exp(-5,7198 - 3,9059 * \text{Albúmina} - 0,7375 * \text{Lisozima} - 2,7929 * \text{Lactoferrina} + 0,1507 * \text{Edad (años)} + 1,2206 * (-1 \text{ si es hombre}) + 7,1682 * \text{Albúmina} * \text{Lactoferrina} + 4,4090 * \text{Albúmina} * \text{Lisozima} - 10,7566 * \text{Lisozima} * \text{Lactoferrina})}{1 + \exp(-5,7198 - 3,9059 * \text{Albúmina} - 0,7375 * \text{Lisozima} - 2,7929 * \text{Lactoferrina} + 0,1507 * \text{Edad (años)} + 1,2206 * (-1 \text{ si es hombre}) + 7,1682 * \text{Albúmina} * \text{Lactoferrina} + 4,4090 * \text{Albúmina} * \text{Lisozima} - 10,7566 * \text{Lisozima} * \text{Lactoferrina})}$$

35 en donde el sujeto tiene ojo seco, si la puntuación de probabilidad de corte calculada es del 50 % al 60 %.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 50 % y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 88 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 76 % del tiempo.

40 8. El método de la reivindicación 6, en donde el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 55 % y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 84 % del tiempo y clasifica correctamente a los sujetos como sanos el 80 % del tiempo.

9. El método de la reivindicación 6, en donde el método tiene una puntuación de probabilidad de corte del 60 % y clasifica correctamente a los sujetos como que tienen ojo seco el 81 % del tiempo y clasifica correctamente a los

sujetos como sanos el 86 % del tiempo.

10. El método de la reivindicación 6, en donde la etapa de determinar el nivel de al menos un constituyente lagrimal seleccionado del grupo que consiste en: albúmina sérica humana, lactoferrina y lisozima, se realiza usando un dispositivo, comprendiendo el dispositivo:

- 5 a. una tira reactiva configurada para recibir una muestra lagrimal del paciente; y
- b. una pluralidad de almohadillas de reactivos, en donde una primera almohadilla de reactivo individual contiene reactivos específicos para la albúmina sérica humana, una segunda almohadilla de reactivo contiene reactivos específicos para la lisozima, y una tercera almohadilla de reactivo contiene reactivos específicos para la lactoferrina, en donde los reactivos en la primera, segunda y tercera almohadillas de reactivos, al entrar en contacto con la muestra lagrimal, experimentan una reacción configurada para producir un color, en donde la intensidad del color es proporcional a la cantidad de albúmina sérica humana, lisozima y lactoferrina presente en la muestra lagrimal, y en donde el la tira reactiva está configurada para suministrar la muestra lagrimal a la pluralidad de almohadillas de reactivos.
- 10

FIGURA 1

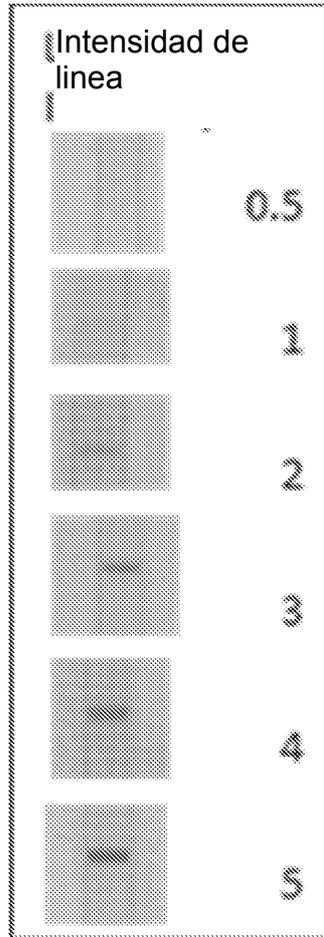
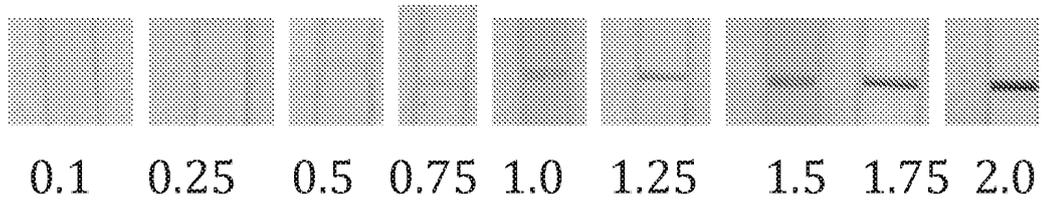


FIGURA 2



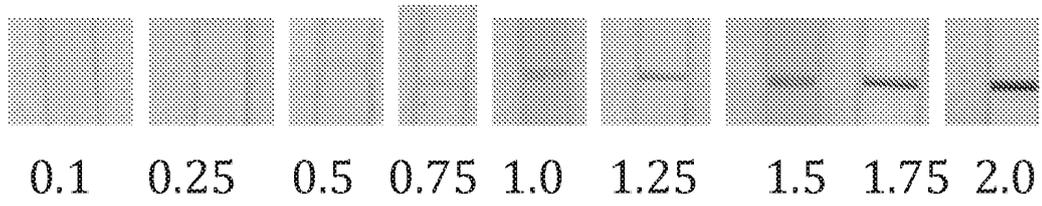
Analito/concentración									
Lactoferrina ug/ml	1	4	12.5	25	50	75	100	150	200

FIGURA 3



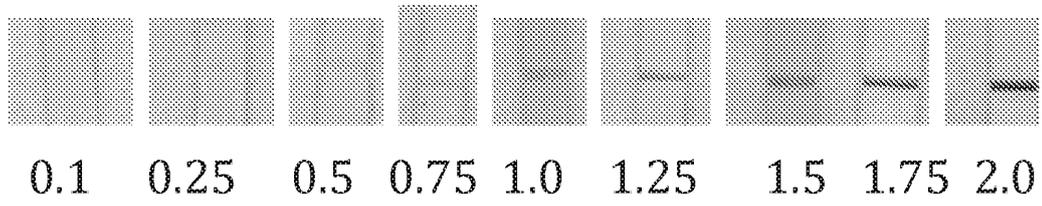
Analito/concentración									
Albúmina sérica humana [HAS] µg/ml	0	0.1	0.5	0.75	1	1.1	1.2	6	10

FIGURA 4



Analito/concentración									
Lisozima ug/ml	0	1	3	12	25	40	70	100	150

FIGURA 5



Analito/concentración									
Mucina ug/ml	0	0.1	0.5	1	3	6	12	25	50

FIGURA 6

