

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 454**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/554** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013 PCT/EP2013/070664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13771520 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2904396**

54 Título: **Utilización de bacterias de Leptospira fainei serovariedad Hurstbridge para diagnosticar la leptospirosis**

30 Prioridad:

**04.10.2012 EP 12306215**

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

**25.06.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)  
25-28, rue du Docteur Roux  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BOURHY, PASCALE;  
CHANTEAU, SUZANNE;  
GOARANT, CYRILLE;  
PICARDEAU, MATHIEU;  
NATO, FARADIBANO y  
DARTEVELLE, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 769 454 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

Utilización de bacterias de *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge para diagnosticar la leptospirosis.

5 **Antecedentes de la invención**

Los brotes epidémicos de leptospirosis son un problema de salud pública significativo y creciente en muchos países tropicales y subtropicales. La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por espiroquetas del género *Leptospira*, que se clasifican en 9 especies patógenas y más de 200 serovariedades sobre la base de la heterogeneidad estructural en el componente de hidrato de carbono del lipopolisacárido. Las infecciones humanas son endémicas en la mayoría de los climas tropicales y en la mayoría de los climas moderados. Globalmente, se produce anualmente un número estimado de >500,000 casos graves, con tasas de mortalidad que superan el 10%.

Asimismo, se da a conocer que esta enfermedad infecciosa ignorada es una enfermedad emergente o reemergente en países industrializados, con probables impactos crecientes debido al calentamiento global y al aumento de casos relacionados con viajes [Lau C, Travel Med Infect Dis. 2010]. La incidencia está subestimada debido a la presentación clínica muy variable, que se caracteriza por signos y síntomas no específicos; a menudo, la leptospirosis se confunde con otras enfermedades, tal como dengue, rickettsiosis, fiebres entéricas y malaria. Se reconoce que la tríada completa de la enfermedad de Weil (insuficiencia hepática, insuficiencia renal y hemorragia) da cuenta de menos de un tercio de los casos humanos [Mac Bride A.J. et al., Curr. Opin. Infect. Dis. 2005]. La mayoría de los signos y síntomas tempranos apuntan a la denominada "fiebre aguda de origen desconocido" (FUO), un reto diagnóstico importante en áreas tropicales y subtropicales. Debido a los síntomas no específicos en leptospirosis humana, se necesita la confirmación biológica para averiguar la enfermedad. En muchas regiones endémicas, los diagnósticos de laboratorio de leptospirosis no están disponibles debido a la falta de ensayo de diagnóstico fiable, rápido y simple para un diagnóstico cercano al paciente de la leptospirosis humana.

Asimismo, un tratamiento antibiótico temprano y apropiado es un determinante clave del resultado en la leptospirosis [Suputtamongkol Y. et al, PLoSNegl. Trop. Dis. 2010], debido a que, contrariamente a muchas enfermedades similares (por ejemplo, dengue), la leptospirosis se puede tratar fácilmente con antibióticos en sus etapas tempranas. Sin embargo, el diagnóstico se ha de confirmar antes del 5º día tras el comienzo de la enfermedad, cuando el tratamiento con antibióticos es muy eficaz.

Por lo tanto, desde hace mucho tiempo se ha reconocido la necesidad de ensayos de diagnóstico rápidos (RDT) fiables para diagnosticar la leptospirosis humana. Preferentemente, estos RDT deberían ser portátiles, de manera que se puedan usar directamente a la cabecera del paciente, incluso en centros de salud remotos, para mejorar el manejo clínico de los pacientes de leptospirosis en dispensarios remotos de regiones tropicales y subtropicales.

Actualmente, el diagnóstico de laboratorio para leptospirosis se basa en la detección de anticuerpos producidos contra la bacteria *Leptospira* mediante técnicas serológicas tales como el ensayo de aglutinación microscópica (MAT), o de ácidos nucleicos de las espiroquetas mediante PCR [Goarant C. Trop. Med. Int. Health, 2009]. Sin embargo, estas técnicas son inapropiadas para el cuidado clínico temprano en centros de salud periféricos que soportan la mayor parte de la carga de leptospirosis, debido a que consumen tiempo y requieren materiales sofisticados que solamente están disponibles muy frecuentemente en laboratorios de referencia centrales [HartskeerlRA, Clin. Microbiol. Infect. 2011]. Asimismo, las técnicas serológicas tales como el ensayo de aglutinación microscópica (MAT) están limitadas por el hecho de que usan pocos grupos representativos de antígenos serovariedades, de manera que una reacción negativa en muestras en serie no excluye la posibilidad de que el paciente pueda estar realmente infectado con una serovariedad de *Leptospira* no incluido en la batería de los antígenos ensayados. Las técnicas a base de PCR, aunque son ensayos muy sensibles y tempranos, son técnicamente exigentes, y las leptospirosis desaparecen de los vasos sanguíneos aproximadamente en el día 7 tras la infección.

Además, los ensayos a base de ELISA que usan como antígenos lisados de células completas brutos de cepas de *Leptospira* (habitualmente la cepa Patoc 1 del saprofito *L. biflexa* serovariedad Patoc) pueden no reconocer la diversidad de cepas circulantes, y la sensibilidad de estos ensayos es generalmente mala (Mc Bride A.J. et al, Curr. Opin. Infect Dis, 2005).

De este modo, la confirmación biológica de la leptospirosis actualmente no es satisfactoria, puesto que no es fiable, es tediosa y raramente está disponible de manera temprana.

De hecho, un reto importante es todavía descubrir antígenos que se conserven a lo largo de las principales cepas de *Leptospira*, puesto que tales antígenos serían potencialmente reconocidos por la mayoría de los anticuerpos generados en pacientes infectados con *Leptospira*.

En el contexto de la presente invención se ha identificado un antígeno de *Leptospira* que permite la detección de un amplio espectro de anticuerpos dirigidos contra la mayoría de las serovariedades. Este antígeno de *Leptospira* es expresado por las bacterias de la serovariedad Hurstbridge, que se aisló originalmente de cerdos en Australia [Perolat P. et al, Int. J. Syst. Bacteriol. 1998] y está actualmente clasificada en la especie *Leptospira fainei*, que es conocido que asimismo infecta a seres humanos [documento WO 98/40099 y Chappel R.J. et al, Epidemiol. Infect., 1998]. De hecho, en el contexto de la presente invención se demuestra que este antígeno presenta una elevada reactividad frente a anticuerpos generados por varios serogrupos de leptospirosis, incluso relacionados serológicamente de forma distantes, tales como los subgrupos Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe y Tarassovi, en muestras séricas de un número de pacientes franceses metropolitanos. Debe mencionarse que los resultados positivos falsos se excluyen, puesto que la serovariedad Hurstbridge está pobremente representada fuera de Australia y Nueva Zelanda. En el contexto de la presente invención asimismo se identifica un método para inactivar las bacterias de la serovariedad Hurstbridge a fin de potenciar la exposición de dicho antígeno a la superficie de las células bacterianas.

Usando tal antígeno, es posible desarrollar diferentes ensayos de diagnóstico rápido (RDT) que presentan una sensibilidad y especificidad elevadas por numerosas serovariedades de *Leptospira*.

Como se describe a continuación con mayor detalle, en el contexto de la presente invención se desarrollaron dos RDT diferentes, que son i) un ensayo de ELISA y ii) un ensayo con tira reactiva mediante inmunocromatografía de flujo vertical, usando estos dos RDT, como antígeno, bacterias de *Leptospira fainei* inactivadas por calor, para detectar en muestras séricas humanas IgM humano anti-*Leptospira*. La robustez de estos dos RDT es muy satisfactoria en términos de sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, y período de caducidad.

Es posible usar el ELISA y el ensayo de tira reactiva de la invención como herramientas de diagnóstico robustas, simples y rápidas para diagnosticar leptospirosis en pacientes que presentan signos y síntomas tempranos de la misma.

Además, puesto que el ensayo de tira reactiva de la invención no requiere un sistema de análisis caro y complejo, se puede usar por lo tanto en centros de salud remotos, o en dispensarios remotos de regiones tropicales y subtropicales.

Puesto que las bacterias de *Leptospira fainei* presentan una reactividad elevada frente a anticuerpos generados por varios serogrupos de leptospirosis, en el contexto de la presente invención asimismo se proponen usar como antígeno las bacterias de *Leptospira fainei* en un ensayo de aglutinación microscópica (MAT).

### Leyendas de las figuras

La figura 1 describe los valores predictivos positivos y negativos (PPV, NPV) para el diagnóstico de leptospirosis usando la tira reactiva de IgM de la invención, usando 187 muestras séricas positivas y 221 negativas.

La figura 2 describe los valores predictivos positivos y negativos (PPV, NPV) comparativos para el diagnóstico de leptospirosis usando la tira reactiva de IgM de la invención y un ensayo de IgM de flujo lateral comercial. Esta comparación se llevó a cabo sobre 72 muestras séricas positivas y 72 negativas, seleccionadas aleatoriamente de muestras de Nueva Caledonia.

### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención describe un método *in vitro* para diagnosticar una infección por *Leptospira* en una muestra biológica de un sujeto, que comprende una etapa de poner en contacto dicha muestra con células bacterianas de la serovariedad Hurstbridge de la especie *Leptospira fainei*, o una fracción antigénica de dichas células bacterianas, en el que dicha infección por *Leptospira* no es debida a bacterias que pertenecen a dicha serovariedad, y en el que dichas células bacterianas se han inactivado por lo menos con un tratamiento térmico. En otras palabras, cuando el método de diagnóstico de la invención usa bacterias de la serovariedad definida de la especie *Leptospira fainei*, entonces este método no está destinado a ser usado para el diagnóstico de una infección mediada por esta serovariedad definida.

Como se usa en la presente memoria, el término "antígeno" significa en la presente memoria cualquier molécula (por ejemplo, proteína, lipoproteína, polisacárido, y/o glicoproteína) que hace que el sistema inmunitario produzca anticuerpos frente a dicha sustancia. Un antígeno "inmunógeno" es un tipo específico de antígeno que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria adaptativa si se inyecta solo. A nivel molecular, un antígeno se caracteriza así por su capacidad para ser reconocido y "unido" por el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

En el contexto de la presente invención, la expresión "fracción antigénica" designa un antígeno que es expresado específicamente por células bacterianas de la especie *Leptospira fainei*. Este antígeno es accesible

especialmente cuando dicha bacteria se ha inactivado con un tratamiento térmico y opcionalmente con un tratamiento químico. De forma importante, este antígeno es expresado por un número de bacterias de otros serogrupos o serovariedades. De forma más precisa, dicha fracción antigénica corresponde a un antígeno i) que es expresado por las células bacterianas de la especie *Leptospira fainei*, y ii) que es reconocido por anticuerpos que se encuentran en el suero de sujetos infectados con bacterias que pertenecen a los siguientes serogrupos: Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Grippityphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe y Tarassovi.

*L. fainei* pertenece al grupo intermedio de *Leptospira* [Perolat P., Int. J. Syst. Bacteriol., 1998]. Sin limitarse por la teoría, se hipotetiza que esta especie puede compartir rasgos antigénicos comunes con saprofitos y patógenos que constituyen los otros dos grupos filogenéticos en el género *Leptospira*. Esto explicaría el motivo por el que este antígeno es reconocido por varios anticuerpos anti-*Leptospira*, y en particular anticuerpos generados en sujetos que están infectados con bacterias que no pertenecen a la especie *L. fainei*.

Dicha fracción antigénica puede ser una proteína, una lipoproteína, un polisacárido, y/o una glicoproteína. Preferentemente es lipopolisacárido (LPS, que permanece intacto al calentar las células bacterianas), una proteína segregada, una proteína citoplásmica, o una proteína de la membrana celular de las bacterias de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge, por ejemplo, una proteína de membrana de envoltura. Más preferentemente, dicha fracción antigénica es LPS.

En el contexto de la presente invención, se afirma que una fracción antigénica (o un antígeno) es "reconocida", "reconocida específicamente" o "unida" por un anticuerpo si dicho anticuerpo presenta una constante de afinidad  $K_a$  (que es la inversa de la constante de disociación, es decir,  $1/K_d$ ) mayor que  $10^5 M^{-1}$ , preferentemente mayor que  $10^6 M^{-1}$ , más preferentemente mayor que  $10^7 M^{-1}$  para dicho antígeno (o epítipo).

El método de diagnóstico de la invención requiere la utilización de células bacterianas (o fracción antigénica de las mismas) de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge. En una forma de realización preferida, dichas bacterias son células de la cepa BUT 6, que se aislaron originalmente de cerdos en Australia [Perolat P. et al, Int. J. Syst. Bacteriol., 1998] y ahora se clasifican en la especie *Leptospira fainei* [Chappel RJ. et al, Epidemiol. Infect., 1998]. A estas bacterias se les ha proporcionado la referencia *L. fainei* Hurstbridge 1, y están disponibles en colecciones internacionales (por ejemplo, ATCC BAA-1109<sup>T</sup> o CRBIP6.1209<sup>T</sup>). La secuencia parcial del ADN<sub>r</sub> de 16S de la cepa prototipo de *L. fainei* tiene como referencia el número de acceso GeneBank U60594, AY631885, AY995712 y FJ154578. El método de diagnóstico de la invención usa células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* que se han inactivado o exterminado previamente, mediante un tratamiento térmico. Algunos de estos tratamientos se describen en Terpstra WJ. et al., Zentralbl Bakteriologie A. 1980.

Estos tratamientos particulares se denominan en la presente memoria a continuación "métodos inactivantes" de células bacterianas. Permiten inactivar células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* para inducir la aparición del antígeno, que entonces se puede usar en el método de diagnóstico de la invención.

En una forma de realización, se usan células bacterianas completas de la especie *Leptospira fainei*. Estas células bacterianas completas se obtienen preferentemente inactivándolas (mediante calentamiento, como se describe a continuación), y opcionalmente tratándolas con agentes conservantes. Estos agentes conservantes son bien conocidos en la técnica.

En una forma de realización, las células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* se inactivan por medio del denominado "método inactivante", que comprende por lo menos una etapa de inactivar dichas células bacterianas con un tratamiento térmico (por ejemplo, a una temperatura elevada). Este método inactivante se lleva a cabo sobre células bacterianas de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge.

Se puede llevar a cabo una etapa opcional de tratamiento mecánico (por ejemplo, por medio de una prensa francesa, ultrasonidos, etc.).

El método inactivante comprende por lo menos un tratamiento térmico. De este modo, las células bacterianas inactivadas usadas en la invención se inactivan por calor. En este método inactivante a base de calor, la etapa de calentamiento se realiza típicamente sometiendo las células bacterianas vivas de la especie *Leptospira fainei* a temperatura elevada durante por lo menos alrededor de 10 minutos, preferentemente durante por lo menos alrededor de 20 minutos, y más preferentemente durante por lo menos alrededor de 30 minutos, y a lo sumo durante alrededor de 1 hora. A fin de inactivar eficientemente (es decir, por lo menos 90% de las células bacterianas, y preferentemente casi el 100% de ellas), la temperatura está comprendida preferentemente entre alrededor de 60°C y 150°C, más preferentemente entre alrededor de 90°C y 110°C, e incluso más preferentemente alrededor de 100°C. Este tratamiento térmico se puede llevar a cabo en cualquier sistema que proporcione una temperatura elevada durante el tiempo requerido (por ejemplo, en un horno, un calentador seco, o un baño hirviendo). Preferentemente el tratamiento térmico se lleva a cabo en un baño hirviendo. En este caso, resulta preferido que las células se mantengan aisladas del agua en un recipiente seguro.

En otra forma de realización, las células bacterianas inactivadas por calor de la especie *Leptospira fainei* se tratan además químicamente, por ejemplo, con un agente químico inactivante.

En esta forma de realización, dicho agente químico inactivante se define como cualquier agente químico que tiene propiedades conservantes y/o antisépticas. En particular, la conservación de la morfología (forma y estructura) de las células bacterianas es importante en el contexto de la invención, puesto que el antígeno se puede expresar en la superficie de las células bacterianas. En consecuencia, dicho agente químico inactivante es preferentemente un agente fijador, por ejemplo, seleccionado de entre el grupo que consiste en: aldehído (tal como formaldehído, glutaraldehído, y paraformaldehído), alcoholes (tal como metanol, etanol), acetona, agentes oxidantes (tal como tetróxido de osmio, dicromato potásico, ácido crómico, y permanganato de potasio), y similares. Dicho agente químico inactivante se selecciona más preferentemente de entre el grupo que consiste en: formaldehído, y paraformaldehído. El tratamiento químico debería durar suficientemente de manera que se inactiven (en otras palabras, no deberían quedar en la muestra bacteriana células bacterianas vivas) por lo menos 95% de las células bacterianas (y preferentemente casi el 100% de ellas). El tratamiento químico durará típicamente por lo menos alrededor de una hora, y más preferentemente por lo menos alrededor de dos horas, e incluso más de 10 horas, como máximo alrededor de 24 horas. La duración y la temperatura de la reacción dependen obviamente de la elección del agente químico y de su concentración. Puesto que los agentes químicos que se pueden usar para inactivar bacterias son conocidos y se han comercializado durante décadas, será fácil para el experto en la materia determinar las condiciones (por ejemplo, duración, temperatura, concentración, etc.) de uso para inactivar por lo menos 95% de (y preferentemente todas) las células bacterianas con cualquier agente químico dado. Por ejemplo, como se describe a continuación, el método de diagnóstico de la invención requiere la utilización de células bacterianas que se han tratado con un 0,2% v/v de formaldehído (formalina) durante dos a seis horas.

De manera importante, el tratamiento inactivante por calor y el químico o mecánico se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

Sin embargo, en una forma de realización preferida, las células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* se tratan en primer lugar químicamente con un agente químico inactivante como se define anteriormente, y en segundo lugar se calientan a una temperatura elevada y opcionalmente de forma mecánica, por ejemplo, en las condiciones definidas anteriormente. En una forma de realización más preferida, el método de diagnóstico de la invención requiere la utilización de células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* que se ha tratado en primer lugar con, como un tratamiento químico inactivante, 0,2% v/v de formaldehído (formalina) durante dos a seis horas, y después se han calentado durante 45 minutos en un baño hirviendo.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra que puede contener anticuerpos específicos contra *Leptospira*, tal como cualquier fluido biológico, por ejemplo, muestra de suero, muestra de plasma, muestra de sangre, muestra de linfa, muestra de orina, o muestra de fluido cerebroespinal (CSF). El plasma sanguíneo es el componente líquido de la sangre, en el que se suspenden las células de la sangre. Está compuesto mayoritariamente de agua (90% en volumen), y contiene proteínas, glucosa, factores de coagulación, iones minerales, hormonas y dióxido de carbono disueltos. Se recupera fácilmente puesto que corresponde al fluido sobrenadante obtenido cuando se ha centrifugado la sangre no coagulada. Para obtener muestras de plasma, la sangre se mezcla con una cantidad apropiada de anticoagulante como heparina, oxalato o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), después se mezcla inmediatamente y a conciencia para evitar la coagulación. El suero de la sangre corresponde al plasma sanguíneo sin fibrinógeno o sin los otros factores de coagulación. Estas proteínas son consideradas a menudo como sustancias que interfieren en algunos ensayos, puesto que pueden reaccionar con el reactivo y producir de ese modo resultados inexactos. Por lo tanto, a menudo se prefiere el suero en los ensayos clínicos. Las muestras de suero se pueden obtener fácilmente por el experto en la materia centrifugando muestras de sangre a alrededor de 2500 rpm durante unos pocos minutos y recuperando el sobrenadante.

En una forma de realización preferida, el método de diagnóstico de la invención se lleva a cabo sobre una muestra biológica que es una muestra de suero. Tal muestra de suero se obtiene mediante una recogida de sangre completamente no dañina del sujeto, y de este modo permite un diagnóstico no invasivo de la leptospirosis.

En el contexto de la presente invención, el término "sujeto" se refiere en la presente memoria a individuos humanos o animales.

El método de la invención se lleva a cabo habitualmente en sujetos que se sospecha que padecen leptospirosis. Dichos sujetos presentan habitualmente por lo menos un síntoma que se sabe que está asociado con tal infección. Este síntoma es, por ejemplo, fiebre, escalofríos, mialgia, y/o cefalea intensa.

El método de la invención asimismo se puede aplicar a cualquier individuo que haya sufrido leptospirosis, a fin de detectar la prevalencia del serotipo de anticuerpos antileptospirosis durante o después de un suceso epidémico de leptospirosis.

En el contexto de la invención, la expresión “diagnosticar una infección de *Leptospira*” se refiere al proceso de identificar o detectar si un sujeto o un paciente está infectado o no con bacterias patógenas del género *Leptospira*. Asimismo, se refiere al proceso de monitorizar la progresión de una infección por dichas bacterias. En otros términos, el método de la invención permite diagnosticar en un sujeto una infección inducida por *Leptospira*. Asimismo, permite discriminar sujetos infectados por bacterias de *Leptospira* de sujetos infectados por bacterias de otro género.

Se recuerda en la presente memoria que, cuando el antígeno usado en el método de la invención son células bacterianas de una serovariedad definida de la especie *Leptospira fainei*, la infección por *Leptospira* que se diagnostica según el método de la invención no es debida necesariamente a (o causada por) bacterias que pertenecen a dicha serovariedad. En particular, cuando el antígeno usado en el método de la invención son células bacterianas de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge, la infección por *Leptospira* que se diagnostica según el método de la invención no es debida necesariamente a (o causada por) bacterias que pertenecen a la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge. La infección por *Leptospira* que se diagnostica según el método de la invención no es debida a (o causada por) cualquier bacteria que pertenezca a la especie *Leptospira fainei*, y, en particular, a bacterias que pertenezcan a la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge. En una forma de realización más preferida, la infección de leptospirosis que se diagnostica según el método de la invención es más bien debida a (o causada por) bacterias que pertenecen a uno o más serogrupos escogidos de Hardjo, Louisiana, Shermani, Celledoni, Sarmin, Javanica, Grippotyphosa, Mini, Serjoe, Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe o Tarassovi. En una forma de realización incluso más preferida, la infección de leptospirosis que se diagnostica según el método de la invención es debida a (o causada por) bacterias que pertenecen a uno o más serogrupos seleccionados de entre Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe y Tarassovi.

Como se describe en la presente memoria, la expresión “*in vitro*” se refiere a estudios o experimentos que se llevan a cabo usando muestras biológicas (por ejemplo, muestras de sangre o de suero) que se han aislado de sus organismos hospedantes (por ejemplo, animales o seres humanos). Estos experimentos se pueden reducir, por ejemplo, a la práctica en materiales de laboratorio tales como tubos, matraces, pocillos, microtubos, etc. Por el contrario, cuando se usa en la presente memoria, la expresión “*in vivo*” se refiere a estudios que se llevan a cabo sobre organismos vivos completos.

Un anticuerpo (Ab) es una proteína grande con forma de Y producida por células B que es usada por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar objetos extraños tales como bacterias y virus. Los anticuerpos nativos son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150,000 daltons, que comprenden por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable (o dominio) de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR) o “regiones hipervariables”, que son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno, y que están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de estructura (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuesta desde el término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedante, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4; IgA1 e IgA2. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, es conocido que solamente IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanas activan el complemento; e IgG1 e IgG3 humanas median ADCC más eficientemente que IgG2 e IgG4.

Los anticuerpos de los isotipos IgM e IgG están compuestos por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas unidas mediante enlaces de disulfuro. De manera importante, los anticuerpos IgM forman polímeros en los que múltiples inmunoglobulinas están enlazadas covalentemente juntas a través de enlaces de disulfuro, mayoritariamente como un pentámero, pero asimismo como un hexámero. En su forma pentamérica, tienen una masa molecular de aproximadamente 900 kDa. Debido a que cada monómero tiene dos sitios de unión al antígeno, un IgM pentamérico tiene 10 sitios de unión. Los anticuerpos IgM no se pueden unir a 10 antígenos al mismo tiempo debido a restricciones estéricas. Debido a su naturaleza polimérica, IgM posee elevada actividad.

Debe apreciarse que los anticuerpos IgM son los primeros en aparecer en respuesta a una exposición inicial a un antígeno, y la presencia de IgG específico, en general, corresponde a la maduración de la respuesta de anticuerpo.

5 Con los ensayos de diagnóstico de la técnica anterior, habitualmente se detectaban los anticuerpos de ambos tipos IgG e IgM en la muestra biológica de los pacientes. Por el contrario, sin embargo, los ensayos de tira reactiva y de ELISA de la invención son específicos para anticuerpos de tipo IgM inducidos por la infección de *Leptospira*, de manera que la leptospirosis se diagnostica en una etapa temprana y por lo tanto se puede curar más eficientemente. Además, y debido a que es conocido que los títulos de IgM disminuyen más rápido que los de IgG, algunos resultados de MAT positivos pueden revelar IgGs que permanecen de la exposición previa a leptospirosis, y por lo tanto podrían ser menos específicos que los ensayos específicos de IgM para detectar leptospirosis aguda y reciente.

15 La identificación de los anticuerpos IgM se lleva a cabo usando anticuerpos policlonales, o anticuerpos monoclonales, o fragmentos funcionales de anticuerpos, usados como "agente revelador". Como se usa en la presente memoria, "fragmentos funcionales de anticuerpos" pretende incluir Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, y multímeros de los mismos y fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden generar tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> resultante se puede tratar para reducir los puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab, Fab', y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos asimismo se pueden sintetizar mediante técnicas recombinantes. Un "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, significa un anticuerpo que surge a partir de una población casi homogénea de anticuerpos. Más particularmente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos excepto por unas pocas mutaciones posibles de origen natural que se pueden encontrar en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que surge a partir del crecimiento de un único clon celular (por ejemplo un hibridoma, una célula hospedante eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula hospedante procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y se caracteriza generalmente por cadenas pesadas de una y solamente una clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único antígeno. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes, o epítomos, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único epítomo del antígeno.

Un método de diagnóstico descrito en la presente solicitud puede usar células bacterianas vivas.

40 Las células bacterianas vivas de la especie *Leptospira fainei* se pueden usar, por ejemplo, en un ensayo MAT. Tal ensayo MAT consiste en diluciones en serie de un suero del paciente mantenido en contacto con un volumen igual de una suspensión bien crecida de leptospirosis y leídas microscópicamente estimando una aglutinación del 50% como el título de punto final de la mezcla de reacción. Este ensayo se usa ampliamente en la técnica. De forma breve, las células bacterianas se hacen crecer en un medio apropiado (típicamente el medio de Johnson y Harris modificado de Ellinghausen y Mc Cullough (EMJH) dedicado), y se ponen en contacto con diferentes diluciones del suero ensayado. Entonces se observa la aglutinación bajo un microscopio de campo oscuro.

Ventajosamente, aunque se lleva a cabo con bacterias de una serovariedad definida (por ejemplo, Hurtsbridge), este ensayo MAT permite diagnosticar una infección debida a bacterias que pertenecen a otros serogrupos y/o serovariedades como se menciona anteriormente.

50 El método de diagnóstico de la invención usa células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* que se han inactivado según el "método inactivante" (como se define anteriormente) o fracciones antigénicas de las mismas.

55 En este caso, el método de diagnóstico de la invención puede ser un ensayo ELISA, o un ensayo de tira reactiva. En estos ensayos de la invención, las células bacterianas inactivadas por calor y opcionalmente de forma química de la especie *Leptospira fainei* se inmovilizan sobre un soporte sólido. Dicho soporte es preferentemente una membrana de nitrocelulosa para el ensayo de tira reactiva, o una placa de microtitulación para el ensayo ELISA. Los soportes alternativos que se pueden usar en estos ensayos son bien conocidos por el experto en la materia.

60 Como se usa en la presente memoria, el "ensayo ELISA de la invención" se refiere a un ensayo ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima) que requiere la utilización de células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* que han sido inactivadas según el método inactivante anterior, o fracciones antigénicas de las mismas, estando dichas bacterias o fracciones inmovilizadas sobre un soporte sólido, preferentemente una placa de microtitulación. En la parte experimental de la solicitud se describe un ensayo ELISA según la invención. Los ensayos ELISA se usan ampliamente y están bien descritos en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, el “ensayo de tira reactiva de la invención” se refiere a un ensayo de tira reactiva que requiere la utilización de células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* que se han inactivado según el método inactivante anterior, o fracciones antigénicas de las mismas, estando dichas bacterias o fracciones inmovilizadas sobre un soporte sólido, preferentemente una membrana de nitrocelulosa. En la parte experimental de la solicitud se describe un ensayo de tira reactiva según la invención. Los ensayos de tira reactiva se usan ampliamente y están bien descritos en la técnica.

De manera interesante, en el presente estudio, 11 de 17 pacientes con leptospirosis confirmada se pudieron diagnosticar de forma más temprana con el ensayo de tira reactiva de la invención que con el MAT (ver la tabla 2 a continuación). De manera similar, en 16 de 99 sueros tempranos de casos confirmados, el ensayo de tira reactiva de la invención fue positivo antes de que la seroascensión (10/37) o seroconversión (6/62) se pudiera evidenciar con el MAT. Por lo tanto, el ensayo de tira reactiva de IgM de la invención presenta una positividad más temprana cuando se compara con MAT en sueros en serie. Debido a que un diagnóstico temprano es de importancia primordial en el manejo clínico de la leptospirosis, la posibilidad de averiguar la enfermedad de forma más temprana en el curso de la infección debería ser considerada como una ventaja real.

La inmovilización de las bacterias (o fracciones de las mismas) sobre el soporte sólido se lleva a cabo por medios convencionales que son bien conocidos en la técnica. En el caso de un ensayo de tira reactiva, las bacterias o fracciones de las mismas se pueden pulverizar, por ejemplo, sobre el soporte sólido y se pueden dejar secar hasta la evaporación total de las bacterias o fracciones de las mismas pulverizadas. En el caso de un ensayo ELISA, las bacterias o fracciones antigénicas de las mismas se pueden poner en contacto con la superficie del soporte sólido y se pueden dejar secar hasta la evaporación total, por ejemplo, durante por lo menos 6 horas a alrededor de 4°C, y después las bacterias (o fracciones) no unidas se eliminan por lavado mediante lavados sucesivos.

El soporte sólido sobre el que se inmovilizan las bacterias (o fracciones antigénicas) se pone entonces en contacto con la muestra biológica del sujeto, en condiciones apropiadas de manera que las inmunoglobulinas humanas que están presentes en dicha muestra biológica se puedan unir a las bacterias inmovilizadas (o fracciones de las mismas). Dichas condiciones apropiadas (temperatura, duración, etc.) dependen de cada tipo de soporte, y es una materia rutinaria identificarlas para las bacterias (o fracciones). Por ejemplo, unos pocos segundos (como máximo una hora) son suficientes para la tira reactiva de la invención, mientras que se requieren unos pocos minutos (como máximo doce horas) para el ensayo ELISA de la invención.

El método de diagnóstico de la invención, y en particular los ensayos de ELISA y de tira reactiva de la invención, comprenden además una etapa de detectar las inmunoglobulinas humanas unidas al antígeno inmovilizado. Esta detección se lleva a cabo típicamente con un agente revelador. Este “agente revelador” puede ser un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, ya sea en forma de un inmunoconjugado, o un anticuerpo marcado, a fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

En una forma de realización preferida, dicho agente revelador es preferentemente un anticuerpo anti-IgM humana, más preferentemente un anticuerpo anti-IgM humana que se conjuga con un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos adecuados del grupo prostético incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorot[pi]jazinilamin fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; el ejemplo de material luminiscente incluye luminol, y los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecorina; los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

Asimismo, es posible usar el antígeno acoplado con perlas o nanopartículas. Las perlas o nanopartículas recubiertas que portan el antígeno de la invención se agregarían o inmunocapturarían en presencia de un suero del sujeto que contenga anticuerpos que reconozcan este antígeno. Esta agregación es fácilmente detectable por medios convencionales, tal como mediante microscopía, mediante citometría de flujo, o a simple vista, etc.

Los ensayos de diagnóstico de la invención contienen ventajosamente un control positivo al que el agente revelador se une sin requerir la presencia de los complejos de antígeno-inmunoglobulina humana. Por ejemplo, si el agente revelador es anticuerpo anti-IgM humana, el control positivo puede consistir en IgM humana, o por lo menos la parte constante de la misma.

Cuando la etapa de detección revela que la muestra biológica contiene inmunoglobulinas humanas que son específicas para el antígeno de la invención, dicho sujeto es diagnosticado como que tiene una infección por *Leptospira*. Entonces es posible administrar un tratamiento antibiótico apropiado.

Los tratamientos antibióticos que se usan actualmente para prevenir o combatir contra la leptospirosis son bien conocidos por el experto en la materia. Tales antibióticos incluyen doxiciclina, ceftriaxona, penicilina G y



penicilina A. Se repasan en Levett P.N. et al, Mandell, Douglas, and Bennett's Principales and Practice of Infectious Diseases, 2010.

5 Por lo tanto, la presente solicitud describe un método para identificar *in vitro* si un sujeto se beneficiará del tratamiento con una composición que contiene antibiótico, comprendiendo el método:

10 a) llevar a cabo el método de diagnóstico de la invención sobre una muestra biológica de dicho sujeto, como se define anteriormente, usando células bacterianas de una serovariedad de la especie *Leptospira fainei* o una fracción antigénica de dichas células bacterianas, y

15 b) identificar si el sujeto se beneficiará del tratamiento con una composición que contiene antibiótico si dicha muestra biológica contiene inmunoglobulinas humanas que son específicas para dichas células bacterianas de la especie *Leptospira fainei*, o para dicha fracción antigénica de dichas células bacterianas.

20 Preferentemente, las células bacterianas usadas en este método son células bacterianas de la especie *Leptospira fainei* que se han inactivado según el método inactivante descrito anteriormente.

25 Preferentemente, las células bacterianas usadas en este método pertenecen a la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge.

Más preferentemente, las células bacterianas usadas en este método son células bacterianas de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge que se han inactivado según el método inactivante descrito anteriormente.

30 Como se hace referencia en la presente memoria, "se predice que un sujeto se beneficiará del tratamiento con una composición que contiene antibiótico" si se diagnostica que sufre leptospirosis mediante el método de diagnóstico de la invención. Este método es una herramienta muy útil para evitar exponer a antibióticos a sujetos que no sufren leptospirosis, previniendo de ese modo la aparición de resistencia bacteriana.

35 La presente solicitud describe una composición que contiene antibiótico para su utilización en el tratamiento de un sujeto que ha sido diagnosticado con leptospirosis usando el método de la invención.

40 La presente solicitud asimismo describe la utilización de un antibiótico para preparar una composición destinada a tratar un sujeto que ha sido diagnosticado con leptospirosis usando el método de diagnóstico de la invención.

45 Además, la presente solicitud describe un método para tratar un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar una composición que contiene antibiótico en sujetos cuya leptospirosis ha sido diagnosticada usando el método de diagnóstico de la invención.

50 La presente descripción asimismo describe kits útiles para llevar a cabo el método de diagnóstico descrito anteriormente.

55 Estos kits comprenden generalmente un soporte sólido recubierto con células bacterianas inactivadas de la especie *Leptospira fainei*.

60 Las células bacterianas que recubren dicho soporte sólido pertenecen a la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge, que han sido inactivadas con el método inactivante descrito anteriormente.

65 Estos kits pueden contener un agente revelador.

Dicho agente revelador puede ser un anticuerpo marcado, más preferentemente un anticuerpo anti-IgM humana marcado. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorot[pi]jazinilamin fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; el ejemplo de material luminiscente incluye luminol, y los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecuorina; los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S o <sup>3</sup>H.

El soporte sólido de dichos kits puede ser una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa.

Estos kits pueden comprender además una muestra de control que asimismo es reconocida por dicho agente revelador. Por ejemplo, si el agente revelador es un anticuerpo anti-IgM humana, el control positivo puede consistir en IgM humana, o por lo menos la parte constante de la misma.

Estos kits asimismo pueden incluir instrucciones para interpretar los resultados obtenidos usando el kit.

Los kits asimismo pueden comprender, por ejemplo, un agente amortiguador, un conservante, o un agente estabilizante de proteínas. Los kits pueden comprender además componentes necesarios para detectar el marcador detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato). Cada componente de un kit se puede encerrar en un recipiente individual, y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un único paquete, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados usando el kit.

La presente solicitud describe células bacterianas de la especie *Leptospira fainei*, que se han inactivado con el método inactivante descrito anteriormente, o fracciones antigénicas de dichas células bacterianas. Como se menciona previamente, estas células bacterianas, o sus fracciones antigénicas, comprenden por lo menos un antígeno universal que es reconocido por un número de anticuerpos específicos para las bacterias *Leptospira* que pertenecen a diferentes serovariedades y/o serogrupos.

Preferentemente, estas células bacterianas pertenecen a la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge.

En una forma de realización preferida, dicha fracción antigénica se escoge de: liposacárido, proteínas citoplásmicas, proteínas segregadas, y proteínas de la membrana de envoltura. Es más preferentemente liposacárido (LPS).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de:

- i) células bacterianas de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge que se han inactivado con el método inactivante por calor descrito anteriormente, o fracciones antigénicas de dichas células bacterianas, o
- ii) el kit de la invención, que contiene dichas células bacterianas,

en un método de diagnóstico para detectar infección de leptospirosis en un sujeto que lo necesita, en el que dicha infección de leptospirosis no es debida a bacterias que pertenecen a dicha serovariedad.

Otras características y ventajas de la presente invención serán manifiestas a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debería entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican formas de realización preferidas de la invención, se dan solamente a título ilustrativo, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán manifiestos para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

## Ejemplos

### I. Material y métodos

#### 1. Preparación del antígeno

El antígeno se preparó en el Institut Pasteur, Unite de Biologie des Spirochetes, París, Francia. Para inocular un litro de EMJH, se usó un precultivo de EMJH de 10 ml de *Leptospira fainei* Hurstbridge BUT 6<sup>T</sup>. Este cultivo de un litro se incubó a 30°C durante 4-7 días con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica mayor o igual a 0.5 a 420 nm. El cultivo se dejó entonces reposar a temperatura ambiente durante 2-6 horas tras la adición de 2 ml de 37% (es decir, 0,2% v/v) de formaldehído (o formalina). El cultivo exterminado con formalina se calentó durante 45 minutos en un baño de agua hirviendo. Finalmente, el pH se ajustó a 9.6, y esta preparación se almacenó a 4°C. Esta preparación bruta se usó directamente como un antígeno fijo en los RDTs (ELISA y tiras reactivas).

#### 2. Desarrollo y producción del ensayo ELISA

##### 2.1. Muestras de suero

Las muestras de suero procedentes de voluntarios sanos sin historial de leptospirosis y seronegativos mediante MAT se recogieron a partir de un biobanco (Platform ICAReB/Investigation Clinique et Acces aux Ressources Biologiques, Institut Pasteur):

Muestras de suero negativas y positivas para leptospirosis se mandaron al National Reference Center of Leptospirosis (Institut Pasteur) con fines de diagnóstico entre 2010 y 2011, y procedieron de pacientes de la Francia continental y las Indias francesas occidentales (Guadalupe y Martinica).

Se establecieron los siguientes grupos sobre la base de MAT (ensayo de aglutinación microscópica), que es el ensayo de referencia hasta ahora para el serodiagnóstico de leptospirosis (estándar de oro):

- Grupo A (controles negativos): Dos serologías del mismo paciente y cuyos resultados permanecieron

negativos en MAT

- Grupo B (casos positivos): Dos serologías del mismo paciente con una seroconversión o seroconversión demostrada (elevación de  $\geq 4$  veces) en MAT con por lo menos un serogrupo de *Leptospira* patógeno y se consideró por lo tanto como un caso de leptospirosis confirmado por laboratorio.

## 2.2. Protocolo de ELISA

Placas de microtitulación de fondo plano (Immulon 1B Thermo, Dutscher) se recubrieron durante toda la noche a 4°C con 75  $\mu$ l de disolución antigénica bien homogeneizada. Alternativamente, la disolución antigénica se dejó evaporar a 37°C durante 1-3 días. Las placas recubiertas se almacenaron entonces en un sitio seco a temperatura ambiente hasta dos años.

Las placas se lavaron tres veces con PBS-0.2% de Tween 20 (PBST), después se incubaron durante 1 h a 37°C (o toda la noche a 4°C) con disolución de bloqueo, 75  $\mu$ l de PBS-leche 5% (PBSM) (polvos:Dutscher) pH 7.2. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con PBST. Duplicados de la disolución de 75  $\mu$ l de los sueros del paciente en PBSM (1:400) se incubaron durante 1 h a 37°C. Como patrones internos, en cada placa se incluyó un intervalo de diluciones de un conjunto de muestras séricas positivas (1:400 a 1:204800) y un control negativo. Este conjunto estaba constituido por 50 muestras séricas positivas que exhiben títulos recíprocos de MAT  $\geq 800$  con por lo menos un serogrupo de *Leptospira* patógeno.

Las placas se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron a cada pocillo 75  $\mu$ l de conjugado de anti-IgM humana de conejo-peroxidasa (Biorad) diluido a 1:500 en PBSM, y las placas se incubaron durante 1 h a 37°C.

Las placas se lavaron cinco veces con PBST. A cada pocillo se añadieron 75  $\mu$ l de amortiguador de sustrato (0.5 mM de ácido 2-2'-azinodietilbenz-tiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Roche). Las placas se leyeron a 415 nm con un lector de ELISA (Biorad) después de 30 min. de incubación en la oscuridad a 37°C.

El corte de punto final se estableció mediante titulación como el valor medio de OD<sub>405</sub> de las 20 muestras séricas negativas para leptospirosis más 3 desviaciones estándar.

## 2.3. Resultados del protocolo de ELISA

Se analizó un total de 449 sueros:

Técnica	MAT	ELISA IgM
negativo	308 (TN)	304
positivo	141 (TP)	135
TN = negativo verdadero = 308 TP = positivo verdadero = 141 FP = falso positivo = 4 FN = falso negativo = 6		

Sensibilidad:

$$TP/(TP+FN) \times 100 = 141/(141+6) \times 100 = 96\%$$

Especificidad:

$$TN/(TN+FP) \times 100 = 308/(308+4) = 99\%$$

Valor predictivo positivo (VPP):

$$TP/(TP+FP) \times 100 = 141/(141+4) \times 100 = 97\%$$

Valor predictivo negativo (VPN):

$$TN/(TN+FN) \times 100 = 308/(308+6) \times 100 = 98\%$$

Precocidad del ensayo:

n = 282 (141 pacientes)	MAT -/Elisa -	MAT-/Elisa+	MAT+/Elisa-	MAT+/Elisa+
Primeras serologías	n = 80 (57%)	n = 60 (42,5%)	n = 1 (0,5%)	n = 0
Segundas serologías	n = 0	n = 0	n = 6 (4,3%)	n = 135 (95,7%)

En más de la mitad de los casos (57%), el ensayo ELISA de la invención fue positivo en el primer suero, mientras que el MAT fue negativo.

### 5 3. Desarrollo y producción del ensayo de tira reactiva

#### 3.1. Muestras de suero

10 Los casos de leptospirosis se definieron como confirmados cuando una sospecha clínica y epidemiológica se complementó mediante PCR específica positiva que evidencia genomas de *Leptospira* sp. patógena en la sangre u orina del paciente, o cuando dos análisis serológicos que usan el MAT de referencia sobre sueros agudos y convalecientes mostraron una seroconversión (desde nula hasta un título recíproco  $\geq 400$ ) o una seroascensión significativa (por lo menos una elevación de cuatro veces en los títulos recíprocos), según los estándares recomendados de la OMS. Los casos probables se definieron como sospecha clínica y epidemiológica junto con un único suero con un título recíproco de MAT mayor que 400 [Berlioz-arthaud A. et al, Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2007]. El panel de cepas usado para MAT se adaptó a la epidemiología local.

20 Todos los sueros usados en este estudio se enviaron al Institut Pasteur con fines de diagnóstico, y procedieron de pacientes de Nueva Caledonia, Francia continental y las Indias Occidentales francesas (Martinica y Guadalupe). Se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se seleccionaron según las definiciones de los casos, y después se estudiaron de forma enmascarada. Para evaluar la sensibilidad del ensayo de tira reactiva, solamente se usaron sueros positivos según MAT de casos confirmados. La especificidad se evaluó usando sueros sanos o patológicos negativos según MAT procedentes de los laboratorios de referencia del Institut Pasteur en Nouméa (IPNC) o París.

25 El IPNC y el NRC son los laboratorios de diagnóstico de referencia para la leptospirosis. En Nueva Caledonia, la leptospirosis es una enfermedad de declaración obligatoria. Las muestras séricas usadas en este estudio se seleccionaron de las colecciones de IPNC y NRC de sueros producidos de actividades de diagnóstico rutinarias y como parte de la vigilancia de la salud pública. Este biobanco de sueros se declaró al Ministerio Francés de Investigación (DC-2010-1222, Colecciones número 1 y 2). Este estudio fue parte de un protocolo aprobado por el Institut Pasteur (protocolo # RBM2008-16) y el Ministerio Francés para la Educación e Investigación (protocolo # AC-2007-44). Todos los sueros se estudiaron como muestras anónimas.

#### 35 3.2. Protocolo de tira reactiva

La línea de control positivo se obtuvo de una IgM humana purificada (MP Biomedicals) a 2 mg/ml. Tanto la línea de control como la de ensayo se pulverizaron como líneas sobre membranas de celulosa. La preparación bacteriana bruta tratada con formalina se usó directamente como un antígeno fijo para la línea de ensayo. Se usaron partículas de oro marcadas con anti-IgM humana de cabra (BBI International BA.GAHM40/X) como la fase móvil de captura para construir nuestras tiras reactivas de inmunocromatografía de flujo vertical de una etapa, como se describió antes [Chanteau S. et al, PLoS Med, 2006].

45 Los experimentos preliminares determinaron como adecuada una dilución 1/400 de sueros en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS, pH 7.4). De forma breve, las tiras se introdujeron en 200  $\mu\text{l}$  de suero diluido en tubos de poliestireno de 5 ml, durante 15 minutos. Las tiras se retiraron entonces y se colocaron sobre papel de cocina absorbente, y se leyeron en 5 minutos. Todos los resultados se registraron usando una escala de gradiente desde 0 (ninguna traza visible sobre la banda de ensayo) hasta 3+ (intensidad de la banda de ensayo igual a la intensidad de la banda de control). La clasificación incluyó un valor "débil" para trazas bajas pero visibles en la banda de ensayo. Los valores débiles, 1+, 2+ y 3+ se consideraron entonces positivos para el análisis posterior, y 0 se consideró como negativo. Todas las tiras se archivaron para una comprobación posterior.

50 Todos los análisis se llevaron a cabo de forma enmascarada: cualquier persona implicada en un análisis particular no tuvo acceso a los resultados de los otros resultados de ensayo del mismo suero. La sensibilidad se evaluó usando 187 sueros de casos de leptospirosis confirmados con un título recíproco de MAT  $\geq 400$ . La especificidad se evaluó usando 221 sueros negativos (142 de Nueva Caledonia, 79 de la Francia continental): 12 sueros positivos IgM antiviral de Chikungunya, 58 sueros positivos IgM antiviral del dengue procedentes de los 4 serotipos, 6 sueros positivos Ig total antiviral de la hepatitis A, 7 sueros positivos para el factor reumatoide, 25 sueros positivos para sífilis (TPHA y VDRL), un suero de malaria aguda y 112 sueros procedentes de donantes de sangre sanos. Todos estos 221 sueros de control negativo se han evaluado usando MAT, y todos fueron negativos (título  $< 100$ ).

55 El resultado de falso negativo posible debido a un nivel elevado de IgM anti-*Leptospira* (fenómeno de zona) se controló usando dos sueros positivos con títulos de MAT 25,600 y 51,200, respectivamente.

#### 65 3.3. Ensayos de estabilidad

Las tiras se almacenaron a 4°C en hojas metálicas de aluminio cerradas herméticamente, y el ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente de laboratorio (20°-23°C).

5 La semivida predictiva de las tiras recubiertas se evaluó estudiando diluciones en serie de un suero positivo para MAT (título recíproco de MAT = 800, que apunta al serogrupo *Icterohaemorrhagiae*) dos veces por semana a lo largo de un período de 3 semanas de exposición de las tiras a 60°C. Durante este período, el suero de control positivo se mantuvo a 4°C, para evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. Este método de estabilidad acelerado es equivalente a dos años de tiempo real de almacenamiento a 25°C [Banoo et al, Nat. Rev. Microbiol. 2010].

#### 3.4. Reproducibilidad y repetitividad

15 Se llevaron a cabo varios experimentos para evaluar la robustez del ensayo de tira reactiva (reproducibilidad y repetitividad):

- Simulación de condiciones de campos trópicos llevando a cabo los ensayos en paralelo a temperatura ambiente de laboratorio y a 37°C en una incubadora;
- 20 - ensayo enmascarado de un panel de cuatro sueros (3 positivos y uno negativo) mediante tres operadores diferentes en tres días diferentes;
- ensayo enmascarado de un mismo suero 14 veces usando dos lotes diferentes de tiras por el mismo operador;
- 25 - lectura enmascarada de los resultados de las tiras mediante dos técnicos sobre 117 sueros (28 muestras negativas y 89 muestras positivas), y mediante tres técnicos sobre 97 sueros (16 muestras negativas y 81 muestras positivas).

#### 30 3.5. Cinética comparativa de MAT y del ensayo de tira reactiva de la invención

La precocidad de la seroconversión de IgM usando MAT o el ensayo de tira reactiva de la invención se evaluó en sueros en serie (día 2 al día 18 tras el comienzo de los síntomas) procedentes de 17 casos confirmados, sobre la base de la fecha de comienzo según lo declarado por los pacientes.

35 El ensayo de tira reactiva asimismo se usó sobre sueros tempranos procedentes de 99 pacientes confirmados positivos de PCR pero todavía negativos para MAT (títulos recíprocos = 0, 100 o 200).

40 Usando este ensayo de tira reactiva, se estudiaron 150 sueros positivos según MAT procedentes de casos probables, que incluyen 124 sueros procedentes de la colección de IPNC, y 26 del Centro de Referencia Nacional Francés.

#### 3.6. Comparación con 3 ensayos de diagnóstico comerciales

45 Para comparar el RDT recientemente desarrollado con las técnicas actualmente disponibles, se comparó el comportamiento de estos ensayos en sueros idénticos procedentes de Nueva Caledonia. Para evaluar la sensibilidad, se seleccionaron al azar 72 sueros positivos para MAT procedentes de los casos confirmados de los 118 sueros de control de Nueva Caledonia. Para la especificidad, se seleccionaron al azar 72 controles negativos, que corresponden a 10 sueros positivos para IgM antiviral de Chikungunya, 30 donantes de sangre sanos, 11 sueros positivos para IgM antiviral del dengue procedentes de los 4 serotipos, 6 sueros positivos para Ig total antiviral de la hepatitis A, 7 sueros positivos para el factor reumatoide, 7 sueros positivos para sífilis (TPHA y VDRL), un suero de malaria aguda. Los resultados que usan el ensayo de tira reactiva de la invención se compararon con los obtenidos usando dos ensayos Elisa (Leptospira IgM ELISA, Panbio, Inverness Medical, QLD Australia, y SERION ELISA classic Leptospira IgG/IgM, Institut Virion/Serion GmbH, Alemania) y un ensayo de inmunocromatografía de IgM de flujo lateral (Leptocheck, Zephyr Biomedicals, India). El ensayo de ELISA de Serion se usó junto con el absorbente del factor reumatoide, según lo recomendado por el fabricante. Todos los ensayos se realizaron en un período de 5 días. Para los cálculos, los resultados “incierto” de ELISA se consideraron como positivos.

#### 60 3.7. Análisis estadístico

La evaluación del ensayo de tira reactiva de la invención para el serodiagnóstico de leptospirosis se llevó a cabo según el Panel de Expertos de Evaluación, Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Tropicales de la OMS para la evaluación de ensayos de diagnóstico para enfermedades infecciosas [Banoo et al, Nat. Rev. Microbiol. 2010].

Se calcularon la sensibilidad (Se), la especificidad (Sp), los valores predictivos positivos y negativos (PPV y NPV, respectivamente) del ensayo de tira reactiva, usando la serología de MAT de referencia como el estándar de oro. Ambos ensayos se llevaron a cabo en el IPNC. Los intervalos de confianza del 95% (95% CI) se calcularon usando el método de Wilson.

Asimismo, se calcularon los cocientes de verosimilitudes (LR). La LR positiva ( $LR+ = Se/[1 - Sp]$ ) indica cuántas veces es más probable que un resultado positivo se observe en muestras con el trastorno diana que en aquellas sin el trastorno diana. La LR negativa ( $LR- = [1 - Se]/Sp$ ) indica cuántas veces es más probable que un resultado negativo se observe en muestras con el trastorno diana que en aquellas sin el trastorno diana. El ensayo es más exacto cuanto más difiera LR de 1. LR+ por encima de 10 y LR- por debajo de 0.1 fueron consideradas pruebas de diagnóstico convincentes [Jaeschke R et al, JAMA 1994]. Se calcularon los 95% CI para LR+ y LR- [Simel DL. J. Clin. Epidemiol. 1991].

El cociente de posibilidades de diagnóstico (DOR) mide el comportamiento del ensayo al combinar las fortalezas de sensibilidad y especificidad, con la ventaja de la exactitud como un único indicador. Estas características hacen al DOR particularmente útil para comparar ensayos siempre que el balance entre tasas falsas negativas y falsas positivas no sea de importancia inmediata [Glas AS. et al, J. Clin. Epidemiol. 2003]. El DOR se define como el cociente de posibilidades de resultados de ensayo positivos en muestras con el trastorno diana con respecto a las posibilidades de resultados de ensayo positivos en muestras sin el trastorno diana. Se calculó según lo siguiente:

$$DOR = (Se / [1 - Se]) / ([1 - Sp] / Sp)$$

El DOR no depende de la prevalencia, y su valor oscila desde 0 hasta infinito, indicando valores mayores un mejor comportamiento del ensayo discriminatorio. Se calcularon los 95% CI para los valores de DOR [Armitage P. et al, Statistical methods in medical research, 1994].

### 3.8. Resultados del ensayo de tira reactiva de la invención

#### a) Especificidad y sensibilidad

De los 187 sueros positivos del estándar de oro ensayados, 168 tuvieron un resultado de tira reactiva positivo. Los serogrupos putativos de los 19 sueros negativos para tira reactiva fueron: Icterohaemorrhagiae (n=12), Pyrogenes (n=3), Australis (n=2), Panama (n=1), y uno no se pudo determinar debido a la coagulación de múltiples serogrupos.

De los 221 sueros negativos para MAT ensayados, 207 tuvieron un resultado de tira reactiva negativo. Los 14 sueros positivos para tira reactiva se clasificaron como "débil", y procedieron de 9 donantes de sangre sanos y cinco pacientes positivos para IgM antígeno del dengue.

La sensibilidad y especificidad del ensayo de tira reactiva de la invención fueron por lo tanto, respectivamente,  $Se = 89.8\%$  [95% CI, 84.7-93.4] y  $Sp = 93.7\%$  [95% CI, 89.65-96.2]. Los cocientes de verosimilitudes (LR) fueron por lo tanto  $LR+ = 14.18$  [95% CI, 8.52-23.56] y  $LR- = 0.11$  [95%; 0.01-0.17]; y el cociente de posibilidades de diagnóstico DOR de 130.74 [95% CI, 63,65-268,52].

En la Figura 1 se presentan los valores predictivos positivos y negativos según la prevalencia.

La ausencia de falso negativo debido a un fenómeno de zona se demostró usando dos sueros positivos con títulos recíprocos de MAT muy elevados (25,600 y 51,200) diluidos en serie dos veces (1/400 a 1/6,400).

#### b) Estabilidad frente a la temperatura, y método de envejecimiento acelerado para el período de caducidad

Los resultados de la tira reactiva de 10 sueros positivos para MAT realizados a 37°C fueron idénticos a los realizados a 25°C.

Diluciones en serie de dos veces (desde 1/400 hasta 1/12,800) de un suero positivo para MAT (título 800) se ensayaron dos veces a la semana durante tres semanas con la tira reactiva expuesta a 60°C. En el día 1, el título recíproco de la tira reactiva fue 6,400, y siguió siendo el mismo hasta el día 17. En el día 21, el título recíproco disminuyó hasta 3,200 (una dilución del suero).

#### c) Reproducibilidad y repetitividad

Un suero ensayado 14 veces con tiras, procedente de los dos lotes diferentes, proporcionó 14 resultados similares, incluyendo el grado.

La variabilidad entre lectores se evaluó mediante dos operadores independientes en 177 sueros (28 negativos y

149 positivos), de los cuales 157 sueros se leyeron por tres operadores independientes. Estas lecturas proporcionaron una excelente concordancia entre operadores en todos los casos (> 99%), pero una tira reactiva débilmente positiva procedente de un caso probable se clasificó como "débil" por dos operadores, pero negativa por el tercero.

La variabilidad entre operadores asimismo se evaluó usando 4 sueros (tira reactiva clasificada desde negativa hasta 3+) ensayados de forma enmascarada e independientemente en tres días diferentes por tres operadores diferentes. Dos operadores proporcionaron resultados de clasificación perfectamente concordantes en los tres ensayos, el tercero clasificó como "débil" a un suero negativo una vez de los tres ensayos.

d) Cinética comparativa de MAT y RDT

Tabla 2

Paciente	Diagnóstico de leptospirosis	Serogrupo putativo	Sueros ensayados*	MAT positivo*	RDT positivo*
1	PCR+ en sangre en el D4	Icterohaemorrhagiae	D4-6	D6	-
2	PCR+ en sangre en el D8	Icterohaemorrhagiae	D8-9; D11-14	-	D9
3	PCR+ en sangre en el D2	Icterohaemorrhagiae	D2-6	-	D5
4	PCR+ en sangre en el D4	Icterohaemorrhagiae	D4; D6-12	-	D6
5	PCR+ en sangre en el D1	Pyrogenes	D1-2; D4-5; D7	-	D7
6	PCR+ en sangre en el D4	Ballum	D4-6	-	D4
7	PCR+ en sangre en el D6	Icterohaemorrhagiae	D6-8; D11	D11	
8	PCR+ en sangre en el D4	Icterohaemorrhagiae	D4-8	D7	
9	Seroconversión D4-D7	Icterohaemorrhagiae	D4; D7; D9	D7	
10	PCR+ en orina en el D5	Icterohaemorrhagiae	D5-6	D5	
11	Seroascensión D5-D9	Icterohaemorrhagiae	D6, D9, D11	D6	
12	PCR+ en sangre en el D5	Icterohaemorrhagiae	D5-8; D10; D12-13	D13	D5
13	PCR+ en orina en el D8	Icterohaemorrhagiae	D7-12; D17	D17	D7
14	PCR+ en sangre en el D3	Icterohaemorrhagiae	D3-6	D6	D5
15	PCR+ en sangre en el D4	Icterohaemorrhagiae	D3-7; D9-12	D5	D4
16	PCR+ en sangre en el D7	Icterohaemorrhagiae	D7-11; D13-17	D17	D7
17	PCR+ en sangre en el D3	Icterohaemorrhagiae	D3-6	D6	D3

De 17 casos confirmados analizados (ver la tabla 2):

- un paciente (número 1) se seroconvirtió para MAT en el día 6 (apuntando a Icterohaemorrhagiae), pero siguió siendo negativo para el ensayo de tira reactiva.
- De forma opuesta, 5 pacientes confirmados mediante PCR (números 2-6) fueron negativos para MAT, mientras que fueron positivos para el ensayo de tira reactiva. Para uno de estos pacientes (número 6), los ensayos de PCR y de tira reactiva fueron ambos positivos en el día 4 después del comienzo de los síntomas.
- Cinco pacientes (números 7-11) fueron positivos para MAT y el ensayo de tira reactiva en el mismo día (días 5-11 tras el comienzo de los síntomas);
- finalmente, para 6 pacientes (números 12-17), el ensayo de tira reactiva fue positivo de forma más temprana que el MAT (día 3 a día 7). De estos 6, cuatro (números 12, 15, 16 y 17) tuvieron resultados positivos de PCR en sangre y de tira reactiva en el mismo día (en los días 5, 4, 7 y 3 respectivamente).

De manera similar, en 16 de 99 sueros tempranos procedentes de pacientes confirmados de Nueva Caledonia, el ensayo de tira reactiva fue positivo mientras que el MAT todavía era negativo (6 de 62) o presentó títulos bajos (título 100 para 4 de 21; título 200 para 6 de 16).

De 150 sueros procedentes de casos probables de leptospirosis (sueros únicos con un MAT  $\geq 400$ ), 109 proporcionaron un resultado positivo usando el ensayo de tira reactiva de la invención, que corresponde a una concordancia de 72.7% [65 - 79.1].

De éstos, 108 tuvieron un MAT >400, de los cuales 81 (75% [66.1-82.2]) fueron positivos para el ensayo de tira reactiva de la invención, mientras que 63 tuvieron un título de MAT >800, de los cuales 53 (84.1% [73.2-91.1]) fueron positivos para el ensayo de tira reactiva de la invención.

La utilización de 72 muestras de suero positivo del estándar de oro (MAT ≥400 procedentes de casos confirmados) y 72 muestras de suero negativas (MAT <100), seleccionadas al azar, permitió una comparación del ensayo de tira reactiva de la invención con tres ensayos comercialmente disponibles: dos ensayos ELISA y un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral de IgM.

Los resultados de estos ensayos se detallan en la tabla 3.

Tabla 3

MAT	Tira reactiva 1/400	Leptocheck	Elisa Serion (+absorbente de RF)	Elisa Panbio
			Positivo 58	Positivo 53
		Positivo 59		Negativo 5
			Negativo 1	Positivo 0
	Positivo 59			Negativo 1
			Positivo 0	Positivo 0
		Negativo 0		Negativo 0
Positivo 72			Negativo 0	Positivo 0
				Negativo 0
			Positivo 8	Positivo 1
		Positivo 11		Negativo 7
			Negativo 3	Positivo 0
	Negativo 13			Negativo 3
			Positivo 0	Positivo 0
		Negativo 2		Negativo 0
			Negativo 2	Positivo 0
				Negativo 2
Sensibilidad	81.9% [71.5-89.1]	97.2% [90.4-99.2]	91.7% [83-86.1]	75% [63.9-83.6]
Negativo 72	Negativo 69	Negativo 38	Negativo 59	Negativo 72
Especificidad	95.8% [88.4-98.6]	52.8% [41.4-63.9]	81.9% [71.5-89.1]	100% [94.9-100]
LR +	19.7 [6.5-59.9]	2.1 [1.6-2.6]	5.1 [3.1-8.3]	NA
LR -	0.2 [0.1-0.3]	0.05 [0.01-0.21]	0.1 [0.05-0.2]	0.25 [0.17-0.37]
DOR	104.4 [28.4-384]	39.1 [8.9-171.8]	49.9 [17.8-139.7]	NA

NA: No aplicable

\* LR+: Cociente de verosimilitudes positivo – [95% CI]

† LR-: Cociente de verosimilitudes negativo – [95% CI]

‡ DOR: Cociente de Posibilidades de Diagnóstico - [95% CI]

Sensibilidad (%), número de pacientes positivos entre el ensayo de diagnóstico rápido con pruebas serológicas (MAT) de leptospirosis (n=72) - [95% CI].

Especificidad (%), muestras de suero negativas entre el ensayo de diagnóstico rápido procedentes de pacientes sin pruebas serológicas (MAT) de leptospirosis (n = 72) - [95% CI].

El IgM ELISA de Panbio tuvo una especificidad del 100% en estas muestras, junto con la sensibilidad más baja (75%). Esta especificidad del 100% no permite el cálculo de un Cociente de Posibilidades de Diagnóstico (DOR), que, sin embargo, sería muy elevada. El ensayo ELISA de Serion tuvo tanto una buena sensibilidad (91.7%) como una buena especificidad (81.9%), mostrando por lo tanto un buen DOR de 49.9. Otro ensayo de diagnóstico rápido, a saber, Leptocheck (de Zephyr) tuvo una sensibilidad muy buena (91.2%) pero una especificidad bastante baja (52.8%), dando un DOR de 39.1. El ensayo de tira reactiva de la invención presentó una especificidad muy buena (95.8%) y una buena sensibilidad (81.9%), y por lo tanto tuvo un DOR muy bueno de 104.4. En la figura 2 se comparan las curvas correspondientes de valores predictivos según la prevalencia de los dos ensayos rápidos de IgM en estas muestras.

Cuando se considera la necesidad de RDT para el diagnóstico clínico, la comparación del ensayo de tira reactiva de la invención con ensayos que están comercialmente disponibles muestra que el ensayo de tira reactiva de la invención tiene una menor sensibilidad (81.9% frente a 97.2%) pero una especificidad mucho mayor (95.8%



frente a 52.8%), y por lo tanto un mejor cociente de posibilidades de diagnóstico (104.4 frente a 39.1). Este mejor comportamiento asimismo es mostrado por la comparación de las curvas de sus valores predictivos según la prevalencia (figura 2).

- 5 De manera importante, para esta evaluación se usaron solamente los sueros procedentes de casos de leptospirosis confirmados. Por lo tanto, las muestras positivas para la evaluación de la sensibilidad fueron tanto positivas para el patrón de oro (un título recíproco de MAT de por lo menos 400) como de casos de leptospirosis confirmados (ya sea una PCR positiva o una seroconversión desde nula hasta  $\geq 400$ , o un aumento de  $\geq 4$  veces en títulos recíprocos de MAT en sueros pareados). Adicionalmente, todos los sueros negativos para la
- 10 evaluación de la especificidad se ensayaron de forma enmascarada usando el MAT de referencia, y solamente se consideraron como verdaderos negativos si el título recíproco de MAT estaba por debajo de 100. Estos últimos procedieron tanto de voluntarios sanos como de una selección de pacientes con patologías de relevancia en países endémicos. Usando esta definición de caso claramente definido, la sensibilidad y especificidad del ensayo de tira reactiva de la invención fueron 89.8% y 93.7% respectivamente. Estos resultados comparan y son
- 15 ligeramente mejores que los dados a conocer por Smits et al., quienes dieron a conocer una sensibilidad de 85.8% y una especificidad de 93.6% con otro ensayo de tira reactiva (Smits HL. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001). Para incrementar el poder estadístico de esta evaluación, se incluyeron muestras de suero tan antiguas como 3 años y 3 meses procedentes de Nueva Caledonia, almacenadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Es bien sabido que el almacenamiento a largo plazo de muestras de suero a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y sus congelaciones/descongelaciones, pueden
- 20 dar como resultado una caída de los títulos de IgM. En realidad, la sensibilidad fue mayor en sueros almacenados durante menos de dos años que en sueros almacenados durante más de dos años (90.6% frente a 81.5%). Esto puede haber dado como resultado una ligera subestimación de la sensibilidad del ensayo de tira reactiva de la invención.
- 25 De forma importante, el ensayo de tira reactiva de la invención reacciona con anticuerpos contra por lo menos los serogrupos Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe y Tarassovi, indicando que el ensayo reacciona ampliamente con anticuerpos montados contra cepas de *Leptospira* que circulan mundialmente.
- 30 Estos resultados demuestran que el ensayo de diagnóstico de la invención es útil en contextos endémicos, especialmente en países de rentas medias y bajas. En realidad, la mayoría de la carga de leptospirosis se produce en la zona rural, con acceso retrasado al laboratorio de referencia. En situaciones epidémicas, especialmente durante períodos después de un desastre, como en Filipinas en 2009, los ensayos de diagnóstico de referencia son raros, si es que alguna vez están disponibles. Por lo tanto, un ensayo de diagnóstico con
- 35 buenos comportamientos de diagnóstico sería asimismo particularmente útil. La utilización del ensayo de tira reactiva de la invención como un cribado inicial para infecciones de leptospirosis permitiría facilitar el diagnóstico diferencial difícil de leptospirosis.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método *in vitro* para diagnosticar una infección de *Leptospira* en una muestra biológica de un sujeto, que comprende una etapa de poner en contacto dicha muestra con unas células bacterianas de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge, o una fracción antigénica de dichas células bacterianas, en el que dicha infección no es debida a bacterias que pertenecen a dicha serovariedad y en el que dichas células bacterianas han sido inactivadas por lo menos con un tratamiento térmico.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dichas células bacterianas han sido tratadas asimismo con un agente inactivante químico.
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicha infección de leptospirosis es debida a unas bacterias que pertenecen a uno o más del serogrupo Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, o Tarassovi.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que es un ensayo ELISA o un ensayo de tira reactiva.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha fracción antigénica se selecciona de entre el grupo que consiste en: LPS, proteínas citoplásmicas, proteínas segregadas y proteínas de membrana de envoltura, y es preferentemente LPS.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho tratamiento térmico se lleva a cabo sometiendo a unas bacterias vivas durante por lo menos 10 minutos a una temperatura comprendida entre 60°C y 150°C, preferentemente entre 90°C y 110°C.
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una etapa de detectar inmunoglobulinas humanas unidas a las bacterias inactivadas inmovilizadas, o fracciones de las mismas con un agente revelador que es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, en forma de un inmunoconjugado o marcado.
- 40 8. Utilización *in vitro* de células bacterianas inactivadas de la *Leptospira fainei* serovariedad Hurstbridge que se han inactivado por lo menos con un tratamiento térmico, o de fracciones antigénicas de dichas células bacterianas, para diagnosticar leptospirosis en un sujeto que lo necesita, en la que dicha infección de leptospirosis no es debida a bacterias que pertenecen a dicha serovariedad.
- 45 9. Utilización diagnóstica según la reivindicación 8, que utiliza además, como un agente revelador, un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, en forma de un inmunoconjugado o marcado.
- 50 10. Utilización diagnóstica según la reivindicación 9, que utiliza además una muestra de control que puede ser reconocida por dicho agente revelador.
- 55 11. Utilización diagnóstica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que dichas células bacterianas o dichas fracciones antigénicas recubren por lo menos un soporte sólido.
12. Utilización diagnóstica según la reivindicación 11, en la que dicho soporte es una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa.
13. Utilización diagnóstica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la que dicho tratamiento térmico ha sido llevado a cabo sometiendo unas bacterias vivas durante por lo menos 10 minutos a una temperatura comprendida entre 60°C y 150°C.
14. Utilización diagnóstica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la que dicho tratamiento térmico ha sido llevado a cabo sometiendo unas bacterias vivas durante por lo menos 10 minutos a una temperatura comprendida entre 90°C y 110°C.
15. Utilización diagnóstica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en la que dichas bacterias inactivadas han sido tratadas asimismo con un agente químico.

Figura 1

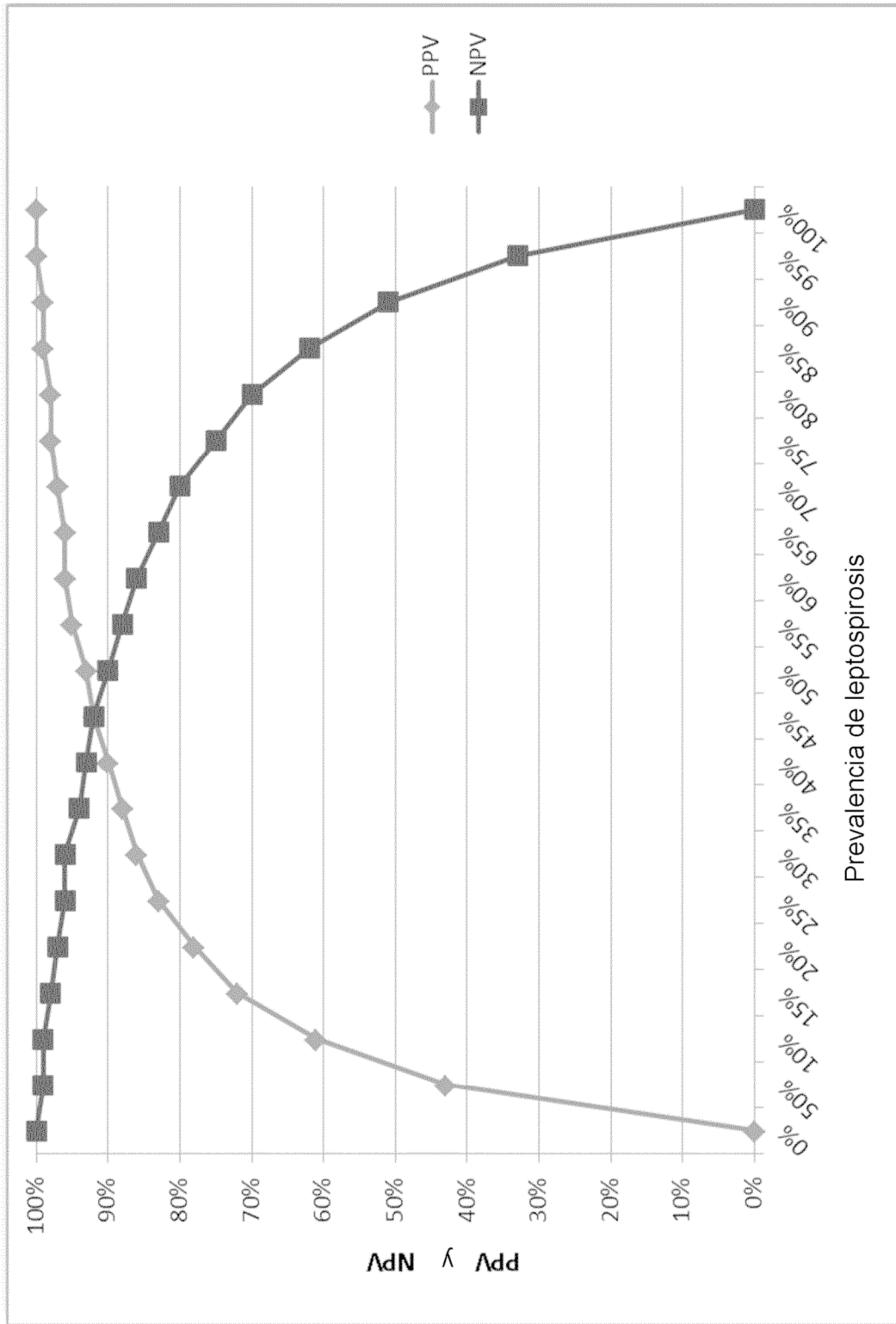


Figura 2

