



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 512**

51 Int. Cl.:
G01N 33/579 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05009273 .3**
96 Fecha de presentación : **28.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1600775**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **Método para la determinación de la reactividad de lipopolisacárido y/o de lípido-A y/o de glucano, siendo esta determinación independiente de factores anti-limulus.**

30 Prioridad: **26.05.2004 DE 10 2004 025 780**

73 Titular/es: **Thomas Stief**
Limesstrasse 15
35415 Pohlheim, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

72 Inventor/es: **Stief, Thomas**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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 la determinación de la reactividad de lipopolisacárido y/o de lípido-A y/o de glucano, siendo esta determinación independiente de factores anti-limulus.

La presente invención se refiere a un mejoramiento del test para determinar la reactividad de lipopolisacárido y/o de lípido-A y/o de glucano en fluidos del cuerpo.

Bajo reactividad se entiende en el contexto de esta descripción la actividad de lipopolisacárido y/o de los lípidos-A y/o de glucano, en especial de beta-1,3-D-glucano, en un líquido biológico, como por ejemplo el plasma. Lipopolisacárido y/o lípido-A y/o glucano reactivo es lipopolisacárido y/o lípido-A y/o glucano que es infisiológicamente y/o farmacológicamente or toxicológicamente activo y/o libre.

Infecciones con bacterias gram-negativas (como *Escherichia coli*) o con hongos (como *Candida albicans*) representan un gran problema médico desde hace mucho tiempo. Los gérmenes pueden invadir en el flujo de la sangre o en el espacio de las meníngeas en el que pueden causar condiciones que amenazan la vida, como sepsis o meningitis. Por lo tanto, estos agentes patógenos que son médicamente muy importantes, deben ser diagnosticados lo antes posible.

Sin embargo, los procedimientos microbiológicos para crecer estos gérmenes son muy lentos. En muchos casos el diagnóstico solamente se puede hacer en días o semanas. Sin embargo, en pocas horas la situación clínica del paciente puede agravarse de tal manera, que el pariente en el peor de los casos se muere debido a esta infección.

Por lo tanto, a menudo se ha tratado de acortar el intervalo temporal para hacer un diagnóstico. Uno de estos enfoques es la detección de lipopolisacáridos (en la siguiente denominado "LPS"), del lípido A, o de glucanos con el llamado Limulus-ensayo. LPS, el lípido A, y glucanos son peligrosos para el paciente, ya que su presencia en la sangre puede causar un patológica coagulación intravascular diseminada (DIC).

La pared de la célula de bacterias gram-negativas en parte consta de LPS (antiguamente denominado endotoxina), que se compone de una parte inofensiva de polisacárido y una parte peligrosa para muchas las células que es lípido-A.

La reactividad de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano es de gran importancia fisiopatológica: LPS activa y/o libre, y/o glucano activo y/o libre, por ejemplo reaccionan muy intensamente con los monocitos de la sangre o con el endotelio.

Entonces los monocitos pueden ser activados o muy firmemente que pueden ser destruidos, y los compartimentos internos de la célula se ponen en contacto con el plasma y los trombocitos.

Dado que monocitos contienen ADN y factor tisular, la coagulación en la sepsis se activa inmediatamente. Una aumentada coagulación intravascular diseminada amenaza la vida como consecuencia de por ejemplo múltiples trombosis en pequeñas embarcaciones de sangre, que pueden causar el fracaso de varios órganos.

Con la invención presente se describe un procedimiento, que imita la interacción fisiopatológica, es decir, la reactividad, de LPS, de lípido-A, de glucano, respectivamente, con células sensibles, en virtud del cual las células y/o membranas de las células son sustituidos *in vitro* por los factores de Limulus. Por lo tanto, un procedimiento de este tipo que detecta con sensibilidad y específicamente en cuestión de minutos LPS, lípido-A o glucanos, en particular LPS y/o lípido-A y/o glucano reactivo y/o libre es de gran importancia clínica.

Según el estado de la técnica LPS se detecta con el test de Limulus [Hurley JC Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. Clinical Microbiology Reviews 1995; 8: 268-292]. El principio de esta prueba es que LPS - pero también glucanos - activan el sistema de coagulogeno/coagulina del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*), este sistema se denomina el sistema de Limulus.

El sistema de limulus consiste principalmente de los siguientes factores: factor C, factor B, factor A, y coagulogeno.

LPS o lípido-A activa el factor C, factor C activado activa el factor B, factor B activado activa el factor A. Factor A activado convierte el coagulogeno soluble en coagulina insoluble.

En el sistema de Limulus de los glucanos, que son componentes de los hongos, también hay un factor G, que se activa por glucanos, en particular por parte de beta-1,3-D-glucanos, a una proteasa serina, que genera factor A activado.

El sistema de Limulus es un sistema de defensa de *Limulus polyphemus* en contra de los gérmenes patológicos y es un primitivo sistema de inmunidad nativa.

En el ensayo de Limulus LPS y/o lípido-A y/o glucanos de la muestra están actuando sobre los factores de amebocitos de Limulus, en la siguiente llamados factores de Limulus, y resultan en cambios, que se pueden detectar en diferentes formas (Hurley JC, Clinical Microbiology Reviews 1995; 8: 268-292, Ochiai *et al.*, Microbiol. Immunol.

2002; 46: 527-533). Estos factores de Limulus se preparan de acuerdo con el estado de la técnica por lisado de amebocitos de Limulus (EE.UU. 3.954.663), de lo cual se deriva el acrónimo LAL.

5 Ejemplos de procedimientos de detección son la prueba de gelación del LAL, la determinación de LAL basada en coagulogeno y el ensayo cromogénico de LAL.

10 En el ensayo cromogénico de LAL (test cromogénico de la reacción de Limulus) la reacción de Factor A activado frente a coagulogeno es imitada por la sustitución de coagulogeno por un sustrato cromogénico, por ejemplo, S-2834® (Isoleucyl-Glutamyl-Glycyl-Arginyl-paranitro-Anilide = Ile-Glu-Gly-Arg-pNA) o S-2423® (CH₃-CO-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA) (Chromogenix, Mölndal, Suecia).

15 El ensayo cromogénico de Limulus es disponible en el comercio, por ejemplo, bajo los nombres comerciales Limulus Amebocyte Lysate Endochrome® (Charles River Endosafe; Charleston, EE.UU.), Coatest® Plasma Endotoxin o Coamatic® Endotoxin (Chromogenix, Mölndal, Suecia) o Pyrochrome® (Cape Code, Falmouth, EE.UU.).

20 El ensayo cromogénico de Limulus puede realizarse en cinética hiperbólica con una medición en un punto final (a 37°C, el tiempo de incubación = 41 min para plasma, según información de producto Pyrochrome®, Haemochrom, Essen, Alemania), es decir, sustrato cromogénico y los factores de Limulus C, B, A se suman a la muestra en que se realizará las pruebas de la endotoxina. En consecuencia, la activación de los factores C, B, A, y la división del sustrato ocurre en el mismo tiempo. Cuanto más largo sea el tiempo de incubación de ensayo antes de la adición del reactivo de interrupción, más factor A activado se genera y más sustrato cromogénico es atacado.

25 Otra posibilidad es que el sustrato cromogénico se puede agregar después de un intervalo de tiempo después de la adición de los factores C, B, A. La desventaja de esto es que durante la acción de la endotoxina sobre los factores C, B, y A más interacciones autocatalíticas y/o autodestructivas ocurren (ver figura 21). El sustrato cromogénico (como se añade en el ensayo de tipo hiperbólico) inhibe parcialmente estas interacciones.

30 El principal problema con la prueba del Limulus es, que la factores anti-Limulus de la muestra, como por ejemplo las proteínas, sobre todo los inhibidores de proteasas de serina, como antitrombina III y/o cofactor II de heparina y/o alfa2-antiplasmina, perturban la activación del sistema de Limulus. Esto significa que el resultado de la prueba del Limulus depende, entre otras cosas del contenido de los factores anti-Limulus en la muestra, como por ejemplo proteínas, especialmente los inhibidores de proteasas de serina como antitrombina III y/o cofactor II de heparina y/o alfa2-antiplasmina (figuras 12,14).

35 Esta interferencia se elimina de acuerdo con el estado de la técnica por 10x dilución de la muestra y por calentamiento de la muestra diluida antes de la prueba del Limulus, por ejemplo, por 15-20 min a 75°C. Por otra parte, la muestra también puede ser acidificada para inactivar los factores anti-Limulus (véase Obayashi, T. *et al.* Clin Chim Acta 149, 55-65, 1985; J. Lab. Clin. Med. 4, 321-330, 1984; EE.UU. 4495294, Tsuji *et al.*, Prog. Clin. Biol. Res., 231, 443-457, 1987). Sin embargo, este procedimiento es problemático, porque LPS y/o lípido-A y/o glucano, que había sido ligado por los inhibidores fisiológicos y es, por tanto, inactivo podrá liberarse de la vinculante, es decir, el método no mide principalmente LPS o lípido-A o glucano reactivo y/o activo y/o libre, pero sobre todo mide LPS o lípido-A o glucano ligado, por lo que este método no es adecuado para la rutina clínica. LPS, lípido-A, o glucano inhibido tiene subordinada importancia fisiopatológica. Además, LPS o lípido-A de la muestra son casi completamente inactivados por tratamiento térmico. La venta en el comercio de tests de Limulus no han encontrado ingreso en la rutina clínica, entre otras cosas, debido a estos problemas.

40 Por ejemplo, hay anticuerpos plasmáticos y otras proteínas que se unen a endotoxina, como el lipopolisaccharide binding protein (LBP), que neutraliza LPS y/o lípido-A y/o glucanos. Sin embargo, este LPS y/o lípido-A y/o glucano ligado y, por tanto, neutralizado es subordinado de importancia clínica. De importancia fisiopatológica es LPS, lípido-A o glucano (como por ejemplo la sustancia de *Candida zymosan* A), que no es neutralizado y/o libre, que puede reaccionar por ejemplo con los monocitos de la sangre; este es llamado LPS o lípido-A o glucano reactivo.

55 El liberamiento de este LPS y/o lípido-A y/o glucano neutralizado por ejemplo por el tratamiento térmico falsificaría el resultado de la prueba y que permitirá una limitada conclusión sobre la concentración de LPS y/o lípidos-A y/o glucano que no es neutralizado.

Además se conoce un procedimiento para la determinación de la actividad de las proteasas de Limulus que se activan por la endotoxina (DE 195 49117).

60 Basándose en este estado de la técnica la tarea de la invención era encontrar un procedimiento simple y el correspondiente sistema apropiado de prueba que permite determinar rápidamente el contenido de LPS activo y/o de lípido-A activo y/o de glucano activo en una muestra, es decir, la reactividad de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano.

65 Otra tarea de la presente invención es encontrar un procedimiento y un sistema apropiado de la prueba, que permite diferenciar LPS activo y lípido-A activo, respectivamente, de glucano activo de una muestra.

ES 2 314 512 T3

Otra tarea de la presente invención es encontrar un procedimiento y un sistema apropiado de prueba que permite determinar LPS y/o lípido-A y/o glucano activo y/o libre de una muestra, y que es insensible a LPS y/o lípido-A y/o glucano neutralizado.

Una aún más la tarea de la presente invención es encontrar un procedimiento y un sistema apropiado de la prueba de funcionamiento con una cinética lineal y/o que es conveniente para la rutina.

Una aún más la tarea de la invención era encontrar un sistema apropiado de la prueba que permite omitir la previa dilución y/o el tratamiento térmico de la muestra para determinar LPS y/o lípidos-A y/o glucano.

Sorprendentemente se mostró que por adición de un oxidante adecuado, en su caso junto con un detergente, como por ejemplo Triton-X100®, de preferencia en una concentración final de hasta el 0,1%, y/o mediador de solución, como por ejemplo polietileno de glicol, de preferencia en una concentración final de hasta el 10%, la interferencia de la matriz de la muestra (= el ambiente del parámetro) los factores perturbadores en el sistema de Limulus-podría son eliminados.

Aunque se sabe desde EP-A-297597, que por tratamiento de oxidación de los líquidos biológicos la actividad de proteasas de serina o de los inhibidores de proteasas de serina se pueden determinar, sin embargo este documento no se refiere al uso de oxidantes en el test de Limulus. Además, según la presente invención, resultó que para el uso con el sistema de Limulus sustancialmente mayor dosis de oxidante son necesarias, por ejemplo 5-10x más de la dosis que es necesaria para inactivar los inhibidores de proteasas de serina que son sensibles a los oxidantes.

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar el contenido de activo y/o libre lipopolisacárido y/o lípido-A y/o glucano en los líquidos biológicos

a un pH entre 6 y 10 según la reivindicación 1

y comprende

A) Tratamiento de la muestra con al menos un oxidante del grupo de los generadores de oxígeno singlete,

B) Adición de al menos un factor de amebocitos de Limulus a la muestra oxidada, y

C) Determinación de la activación de al menos uno de los factores de amebocitos de Limulus.

Oxidantes según la invención pueden ser de carácter arbitrario, en la medida que se oxidan las anti-Limulus factores de la muestra, especialmente antitrombina III y/o heparina cofactor II y/o la alfa2-antiplasmina.

Ejemplos de oxidantes son generadores de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), como el cloro o sales de HOCl, especialmente cloramina-T® (N-cloro-Toluol-sulfamidas) o cloramina-B® (N-cloro-benzol-sulfonamidas).

De acuerdo con la invención se añaden los oxidantes utilizados en dosis relativamente altas para inactivar factores anti-Limulus, pero sin cambiar la reactividad de LPS y/o de glucano, en particular que debe evitarse reactivar o liberar los inactivos y/o ligados LPS y/o glucano de la muestra y no se debe inactivar activo LPS y/o lípido-A y/o glucano en el procedimiento de la prueba.

Normalmente son unas dosis de oxidante, que son más de 5-10x encima de la dosis que es necesaria para la inactivación oxidativa de inhibidores sensibles a oxidantes de las proteasas serina en el plasma, por ejemplo, antitrombina III o α 2-antiplasmina.

La concentración del oxidante, por ejemplo, cloramina-T®, en el reactivo de oxidante suele ser 15-200 mmol/l, en particular 30-120 mmol/l, especialmente preferido 50-70 mmol/l.

El oxidante es típicamente añadido en una cantidad de 15-200 μmol , en particular 30-120 μmol , especialmente preferido 50-70 μmol por ml de líquido de la muestra, en particular de plasma. El oxidante puede estar presente en 0.9% NaCl y/o en su caso en un buffer, especialmente PBS (pH 7.4), NaHCO_3 (pH 8-9), o citrato (pH 7-9, preferido 7.4-8.4), en particular preferido citrato de sodio en una concentración de 10-200 mM, en particular 20-100 mM, preferido sobre todo 50 mM, si la relación de muestra: reactivo de oxidante es 1:1.

Las dosis más bajas no suelen eliminar la preocupante influencia de la matriz de plasma en el sistema de Limulus; dosis más altas por lo general resultan en un aumento de la inactivación de LPS y/o lípido-A y/o glucanos en el plasma.

Además ha de tenerse en cuenta al realizar el procedimiento de acuerdo a la invención, que después de realizar la reacción de oxidación allí no queden demasiado grandes cantidades de oxidante en la muestra: los factores Limulus-C, B, A son sólo hasta un agregado de cerca de 5 μmoles cloramina-T® por ml de muestra de plasma resistente (en contraste con los típicos proteasas serina de mamíferos, como por ejemplo, la tripsina o la plasmina, que son por lo menos 10x más resistentes, de acuerdo a la razón por la EP-A-297597 antioxidante no es añadido allí).

ES 2 314 512 T3

Por lo tanto después de realizar la oxidación la cantidad restante de oxidante debe ser inactivado, por ejemplo, por un inhibidor de oxígeno singlete.

Así por ejemplo, cuando se utilizan 60 mM cloramina-T® el importe restante de oxidante después del momento de la oxidación es neutralizado por un inhibidor de oxígeno singlete, por ejemplo, ascorbato o preferiblemente metionina, antes de que se añaden los factores de Limulus a la reacción o el inhibidor de oxígeno singlete y los factores de Limulus se añaden al mismo tiempo.

Preferencia tienen cantidades de oxidante, en particular cloramina, según paso a) en la muestra en el rango entre 20 a 100 µmol por ml de muestra de plasma.

Según paso b) se utilizan reactivos de factores de amebocitos de Limulus de reactivos que pueden ser conocidos, que se producen por la lisis de amebocitos de Limulus (los llamados LAL), que sin embargo, también podrían ser producidos gen-técnicamente. Preferentemente utilizado aquí es el Pyrochrome®-reactivo, que, en comparación con Coamatic® es más sensible a LPS. Referencias sobre LAL dentro de esta descripción han de entenderse de tal manera que también otro de los factores obtenidos de amebocitos de Limulus se puede utilizar.

En el paso b) uno o todos los factores de amebocitos de Limulus se pueden utilizar. Preferencia es el uso de una combinación de los factores A, B y C.

La activación de por lo menos uno de los factores de amebocitos Limulus (LA) se puede determinar en una forma conocida, por ejemplo, midiendo el tiempo de gelación, midiendo la cantidad de coagulina generada por LA-factores o de preferencia por la medición de cromóforo liberado por factores activados desde un compuesto cromogénico que es atacado por factores LA.

Las muestras que se utilizarán de acuerdo con la invención pueden ser arbitrarios líquidos biológicos que podrían contener lipopolisacárido y/o lípido-A y/o glucanos. Ejemplos son sangre, productos sanguíneos, licor, orina, saliva, lavado broncoalveolar, ascites, efusiones pericárdicas o pleurales, leche, líquidos de los tejidos, líquido linfático y en particular plasma. Más muestras que se utilizan son productos, preferidos los productos de fabricación industrial, que contienen anti-Limulus factores, por ejemplo, proteínas plasmáticas terapéuticas como albúmina o antitrombina III.

Además se constató que los líquidos biológicos que contienen heparina pueden influir en los resultados de la prueba a pesar de tratamiento oxidativo: por ejemplo, incluso por oxidación con 1 parte de 60 mM cloramina-T® por 1 parte de plasma hay sólo entonces independencia de la matriz si la muestra contiene menos de 1 UI/ml de heparina.

Porque plasma de pacientes normalmente incluso en el caso de heparina terapéutica contiene menos de 0,5 UI/ml de heparina, casi todos los plasmas de pacientes pueden ser analizados por reactivo LPS y/o lípido-A y/o glucano.

Las muestras con más de 1 U/ml de heparina, que se producen por ejemplo, en los pacientes en hemodiálisis o en cirugía cardíaca con hasta alrededor de 10 UI/ml de heparina, se oxidan con altas dosis de oxidante, por ejemplo, con 100 µmoles cloramina-T® por ml de muestra de plasma, para obtener la independencia completa de la matriz o la heparina debe ser neutralizado por la adición de un inhibidor como Polybrene®.

Preferentemente el test usa comparable bajas concentraciones de oxidantes, para imitar mejor la interacción fisiopatológica de LPS o lípido-A o glucano, respectivamente, con células humanas sensibles (= reactividad de LPS o reactividad de lípido-A, o reactividad de glucano, respectivamente): una concentración de alrededor de 60 mmol/l cloramina-T® es más fisiológica que una de los 120 mmol/l en el reactivo de oxidante (concentraciones de cloramina de unos 10 mmol/l se pueden encontrar en el microambiente de granulocitos neutrófilos activados). Debido a esta razón, de preferencia las concentraciones de oxidante, de preferencia cloramina-T, en el reactivo de oxidante son inferiores o iguales a 100 mmol/l, en particular inferior o igual a 60 mmol/l, (en caso la relación entre la muestra de plasma y reactivos de oxidante es 1:1) preferentemente, en muestras con menos de 1 UI/ml de heparina.

Si procede, un inhibidor de la heparina, e. g. Polybrene® (bromuro de hexadimethrine) se puede agregar a la muestra. Sin embargo, Polybrene® estimula el LPS/sistema de Limulus, que no es en el sentido de una imitación de la reactividad de LPS/monocitos. Sin embargo de acuerdo con el estado de la técnica de preferencia, heparina en muestras del paciente (normalmente de alrededor de 30-60 UI/ml de heparina en plasma, por ejemplo, Endo tubo ET, Chromogenix, Mölndal, Suecia) se utiliza para la prueba del Limulus.

Las muestras que se utilizarán de acuerdo con la presente invención contienen menos de 1 UI/ml de heparina, y un agente que compleja calcio, como citrato o EDTA, en el cual como agente que compleja calcio el citrato se prefiere. Si procede un inhibidor de glucano y/o inactivador y de glucano (como por ejemplo Zwittergent®, en particular Zwittergent® 3-14 (3-(N, N-dimethylmyristylammonio) propano sulfonato) y/o beta-1, 3-D-glucanasa (*Helix pomatia* o *Rhizoctonia solani*) puede añadirse al ensayo para aumentar la especificidad de LPS o lípido-A.

El procedimiento de detección reivindicado puede trabajar con los métodos habituales, como por ejemplo con la cinética hiperbólica. Otro objeto de la presente invención es un procedimiento que convierte la complicada cinética hiperbólica de la prueba del Limulus en una cinética lineal, facilitando enormemente la evaluación.

ES 2 314 512 T3

Se constató que la adición de al menos un compuesto de guanidina, como la arginina o carbonato de guanidina, y/o de un agente caotropico, por ejemplo, un catión de un alkali-metal, tales como K^+ , Na^+ o Cs^+ o un catión de tierra-alkali-metal, como Ca^{++} o Mg^{++} , antes o durante la ejecución de paso c) o junto con los factores de Limulus se obtiene cinética lineal de la prueba.

Especialmente la eliminación de la interferencia de la matriz, sino también la linealización de la prueba del Limulus y en la diferenciación entre la reactividad de LPS o lípido-A, por un lado, y glucanos y por otro lado permite que, por primera vez, determinaciones, que se adaptan a rutina, de LPS y/o lípido-A y/o glucano, en particular de la reactividad de LPS y/o lípido-A y/o glucanos, en líquidos del cuerpo de pacientes, como en sangre o en productos sanguíneos.

Por lo tanto, en un nuevo acuerdo de acuerdo con el procedimiento de la invención la reactividad de LPS o lípido-A puede diferenciarse de la reactividad de los glucanos, de modo que la reacción de ambos grupos de toxinas puede determinarse. Para este propósito el procedimiento anteriormente descrito se realiza en presencia y en ausencia de un inhibidor de LPS o un inhibidor de lípido-A, respectivamente. Estas reactividades se restarán y así la reactividad específica causada por LPS y/o por lípido-A se determina.

Como inhibidor de LPS o como inhibidor de lípido-A, respectivamente, por ejemplo, Polimixina B (1 mg = 7868 UI, Aerosporin, Euro Pharma OTC, Kamen, Alemania, o de Sigma-Fluka, Deisenhofen, Alemania) puede ser utilizado.

Para determinar la reactividad de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano de la muestra, la muestra es primero oxidado por un oxidante, como la cloramina, y la reacción es de preferencia detenida por adición de un antioxidante. Posteriormente, o al mismo tiempo con la adición de los antioxidantes la prueba de Limulus se realiza en forma conocida y las muestras se miden tanto en ausencia (método A) y en presencia de un inhibidor de la endotoxina (método B).

Desde método A la reactividad de LPS+lípidoA+glucano de la muestra se puede determinar, mientras que método B sólo refleja la reactividad de glucano. La diferencia de la reactividad medida, por ejemplo, determinada como la diferencia de la absorción A - B de los liberados chromophores, resultan en el contenido de la reactividad de LPS y de lípido-A en muestras que contienen glucano o que se encuentren libres de glucanos.

Las absorciones de estos determinaciones y las absorciones que se han corregido por la actividad propia de los PMB de enfoque B (Bcorr) se pueden convertir en reactividades de glucanos, por ejemplo, en reactividad, que es como la de zymosan A en $\mu g/ml$.

La diferencia de la absorción A- Bcorr se puede convertir en reactividad de LPS y/o de lípido-A, por ejemplo, en reactividad que es como la de LPS en ng/ml .

La curva de calibración de la prueba es lineal en virtud de la utilización de las medidas descritas arriba hasta alrededor de 10000 ng/ml LPS en plasma normal, especialmente entre 200-300 ng/ml LPS, o hasta alrededor de 100 $\mu g/ml$ zymosan A en plasma normal, en especial entre 2000-3000 ng/ml = 2-3 $\mu g/ml$ zymosan A. Estas reactividades se refieren a un pool de plasma normal que se complementó con estas cantidades de LPS o lípido-A, respectivamente, o de glucano.

Con la cinética hiperbólica reactividades plasmáticas de LPS

alrededor de 1 ng/ml (es decir, 0,1 a 5 ng/ml), son detectables después de unos 60-120 min a temperatura ambiente (RT, alrededor de 23°C),

alrededor de 10 ng/ml (es decir, del 1 al 50 ng/ml) después de unos 30-60 min RT,

alrededor de 100 ng/ml (es decir, de 10 a 500 ng/ml) después de unos 15-30 min RT, en torno a 1000 ng/ml (es decir, de 100 a 5000 ng/ml) después de unos 8-15 min RT, alrededor de 10000 ng/ml (es decir, de 1000 a 50000 ng/ml) después de unos 4-8 min RT, por ejemplo, en función de la variación "lot-to-lot" de la producción comercial de los factores de LAL.

Con la reactividad plasmática de glucano valores comparables estan resultando, sin embargo la reactividad en ng/ml tiene que ser multiplicado por el factor de 100.

Si la muestra contiene más altos valores de LPS y/o lípido-A y/o glucano reactivo, a continuación, la muestra puede ser diluida con un 3-10%, preferido 4-9%, en especial el 7% de albúmina, de preferencia albúmina humana, de preferencia en salina tamponada con fosfato (PBS).

La reactividad de LPS o de lípido-A o de glucano no muestra un efecto inhibitorio a dosis altas, es decir, la extrema concentración de LPS or lípido-A por una parte, o de glucano, por el otro lado, por ejemplo, alrededor de 10000 ng/ml o de 100 $\mu g/ml$, respectivamente, no dan lugar a una inhibición de la reacción de Limulus.

La muestra en la prueba de Limulus aquí descrita debe tener de preferencia una concentración de proteína que corresponde aproximadamente a la del plasma humano, es decir, 30-100 g/l , en particular 60-90 g/l .

ES 2 314 512 T3

El procedimiento según la invención, así como la reacción de oxidación como la reacción de Limulus, se realiza preferentemente a temperaturas entre 0°C y 50°C, especialmente preferido entre los 15°C y 45°C. Además el procedimiento es de preferencia realizado en condiciones fisiológicas, sobre todo en un valor de pH entre 6 y 10, preferido entre 7,0 y 9,5, en especial entre 7,5 y 9,0. Si procede, un tampón puede añadirse al líquido biológico o a los reactivos utilizados, respectivamente.

Además un sistema de prueba se describe que es adecuado para la determinación de la reactividad de lipopolisacárido y/o de lípido-A y/o de glucano. Este se compone de por lo menos un oxidante y de los factores de amebocitos de Limulus para el tratamiento de la muestra.

Especialmente preferido es un sistema adecuado de prueba con cinética lineal para determinar la reactividad de lipopolisacárido y/o de lípido-A y/o de glucano que además contiene a los reactivos mencionados al menos un reactivo que crea una cinética lineal.

Además se describe un sistema de prueba que en adición a los reactivos mencionados contiene al menos un inhibidor de LPS y/o de lípido-A para distinguir entre la reactividad de lipopolisacárido y/o de lípido-A de la muestra, por un lado, y la reactividad de glucano de la muestra, por el otro.

Ahora se describe una actuación típica de la prueba de acuerdo con la invención para determinar la reactividad basal de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano.

El ensayo se realiza preferentemente en dos enfoques, sin embargo, ambos enfoques también se pueden realizar por separado.

Enfoque A (dando la reactividad basal (LPS + lípido-A + glucanos))

1 parte de la muestra (por ejemplo, 10 µl) se incubaron con 1 parte 15-200 mmol/l, preferido 30-120 mmol/l, especialmente 50-70 mmol/l de cloramina-T (CT) en PBS o por adición de 0,1 -2 µmoles, preferido 0,3-1,2 µmoles, en particular 0,5-0,7 µmoles CT en 0,1-100 partes de PBS durante 10 minutos a 37°C (o durante 30 min a temperatura ambiente). A continuación, 1-5 partes, preferida 1 parte, 100-230 mmol/l metionina en H₂O o 1-11,5 µmoles metionina en H₂O se añadieron. Después de 0-5 minutos a temperatura ambiente 0,5-5, preferiblemente 2-3, partes de reactivo de Limulus con o sin sustrato cromogénico para Limulus se agregaron (por ejemplo Pyrochrome®, que había sido reconstituido con antelación con la cantidad de buffer tris (normalmente 3,2 ml 200 mmol/l tris, pH 8) que indica el fabricante para el ensayo de Limulus en cinética hiperbólica). Si procede los antioxidantes y/o el inhibidor de LPS pueden ya estar presente en el material de la reconstitución de los factores Limulus o juntos con los factores liofilizados de Limulus. Para aumentar la especificidad del sustrato cromogénico para los factores de Limulus el reactivo de antioxidantes podría contener un inhibidor de tripsina, en particular aprotinina, de preferencia en una concentración de 100-10000 KUI/ml, en particular 200-2000 KUI/ml y/o una dosis de aprotinina de KUI 100-10000, en particular 200-2000 KUI, por ml de muestra podría ser añadido a la reacción.

La absorción se determinó de inmediato (valor basal) y después de 1-10 minutos (a temperatura ambiente). Un eventual aumento lineal de la absorbancia (delta Ac de control) se determinó. Si la muestra contenía tripsina o una actividad que es similar a la tripsina, como en pancreatitis (alrededor de 10-100 ng/ml tripsina), el aquí aparente lineal delta Ac/min había que estar restado de todos los valores que se hayan determinado en cinética hiperbólica.

Luego, ya sea a temperatura ambiente, el aumento de la absorbancia (deltaA) en 2-15 min distancia se determinó (cinética hiperbólica), o después de 0,5-300 min, preferido 5-100 min, en particular 10-50 min, especialmente preferido 15-30 min (RT) y/o cuando el standard de la reactividad de 10 o de 100 ng/ml LPS un delta A ocurría de 3-30%, especialmente cerca de 15% del delta A que es maximalmente alcanzable, 1-20 partes, preferiblemente 5-10 partes, especialmente 5 partes del reagente de linearización fueron añadidos. Este consistía en una substancia con guanidina, como arginina y/o en un agente caotrópico como un catión de álcali como K⁺, Na⁺ o Cs⁺ o un cation de tierra-álcali como Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (concentración final de preferencia 75-750 mmol/l; preferido una concentración en el reactivo añadido = 100-1000 mmol/l, en su caso con 0,1-2 mmol/l de concentración final de sustrato cromogénico) y el delta A/t se determinó. Se añadió sustrato de preferencia en el caso, si con antelación sustrato no estaba presente en el reactivo de Limulus.

La adición de los reactivos de linealización ha transformado la cinética hiperbólica en una cinética lineal.

Si procede hasta 50 mmol/l, en particular hasta 30 mmol/l, arginina (reactivo de especificidad) se añadió ya en la primera fase de incubación de LAL, porque arginina aumentó la especificidad, pero también disminuyó la velocidad de reacción.

En lugar de arginina según la invención también otra sustancia que contiene un grupo de guanidina se puede elegir tanto para el reactivo de linealización y para el reactivo de especificidad, como por ejemplo carbonato de guanidina; el valor de pH de estos reactivos debe ser entre 7 y 10, sobre todo entre 7,5 y 9,5.

ES 2 314 512 T3

Enfoque B (dando la reactividad basal de glucano)

Las condiciones de incubación son idénticas a enfoque A con el cambio que además se utilizó polimixina B: 0,01-100 mg/ml muestra de plasma, preferido 0,1-10 mg/ml muestra de plasma, en particular 0,2-5 mg/ml muestra de plasma, especialmente preferido 1-3 mg de polimixina B/ml (correspondiente a 10-30 µg polimixina B por 10 µl de plasma, 1 mg = 7868 U).

15000 U/ml de polimixina B neutralizaron hasta 10000 ng/ml reactividad de LPS en un pool de plasma normal en el sistema de Limulus aquí descrito.

El valor determinado de deltaA para pool de plasma normal (sin zymosan A) se ha restado de todos los valores de deltaA. Este fue un deltaA, que se indujo por polimixina B agregada, y que había que estar restado de todos los valores de B.

Si después de esta corrección, el paciente tiene valores positivos de deltaA, estos fueron causados por la reactividad de glucanos.

Si la muestra tenía menos de 50 ng/ml reactividad de LPS, entonces enfoque B podría ser realizado con una adición de 10 veces menos de polimixina B, es decir, especialmente preferido 0,1-0,3 mg/ml de plasma. Ello se tradujo en una mejor sensibilidad del ensayo.

Los valores que se han determinado en el enfoque B y que fueron corregidos (valores basales de la reactividad en plasma normal) se han restado de los de enfoque A. Así la reactividad de LPS en el material investigado se determinó:

$$[\text{LPS} + \text{Lípido-A} + \text{Glucanos}] - [\text{Glucanos}] = [\text{LPS} + \text{lípido-A}].$$

Enfoque C (dando actividad que es como la tripsina)

Como enfoque A, el reactivo de linealización se añadió antes (o si procede de hasta 3 minutos después) del reactivo de Limulus; más incubación después de la adición del reactivo de Limulus no era necesaria.

Enfoque C da la actividad que es como la tripsina (TLAC), que en el caso normal no está presente, por ejemplo, que es positivo en la pancreatitis, en pacientes en unidades de cuidados intensivos con activación de la coagulación, en muestras de plasma después de refrigeración, o en reactivo de Limulus que es viejo. TLAC se expresa en mA/min y tiene que ser restada de todos los valores que se han determinado en A y B.

Como estándares para el procedimiento de acuerdo a la invención, por ejemplo un pool de plasma normal (o el 7% de la albúmina humana), se analizó con una reactividad basal de LPS (BL), de 0,2-2 ng/ml LPS, en particular de 0,4-1,2 ng/ml LPS, que se ha complementado con 0, 1, 10, 100, 1000, 10000 ng/ml LPS. Estas estándares de calibración, por definición, han contenido reactividades de LPS : 0 + BL, 1 + BL, 10 + BL, 100 + BL, 1000 + BL, 10000 + BL ng/ml LPS en plasma normal. Más estándares de calibración tenían 0, 0,1, 1, 10, 100 µg/ml zymosan A. Si procede el ensayo también puede ser normalizado con un control de tripsina (por ejemplo, 100 ng/ml de tripsina en 7% de albúmina-PBS), a fin de determinar el contenido de tripsina activa en la muestra.

Como estándares sustratos fueron elegidos, que tenían una matriz -es decir, un entorno del analito- que es similar a la que rodea el analito de las muestras.

Material adecuado de muestra es particularmente plasma con citrato o con EDTA. Cuando plasmas con EDTA se analizan los estándares deben contener también EDTA.

Si una muestra con una matriz que es diferente de plasma se analizará, por ejemplo, licor cerebrospinalis, orina, lavado broncoalveolar, leche, un producto de la sangre, un factor concentrado comercial, o saliva (saliva contiene fisiológicamente 100-500 ng/ml reactividad de LPS, que es una de las razones porque el ensayo de Limulus es tan problemático), la muestra debe ser llevado a la matrix aproximada de plasma con pool de plasma o llegado el caso con 7% de albúmina humana por una dilución de 1+2 a 1+100, en particular de 1+4 a 1+9, antes de que la muestra se analiza en el aquí descrito ensayo.

Por otra parte, una calibración de adición se puede realizar, es decir, adición de cantidades conocidas de LPS o de lípido-A o de glucano a una muestra, por ejemplo, una medicamento comercial de antitrombina III, y determinación de la reactividad de LPS o de lípido-A o de glucano en la muestra complementada y no-complementada. La diferencia de absorción es equivalente a la cantidad añadida de LPS o de lípido-A o de glucano y indica la cantidad basal de LPS, de lípido-A o de glucano.

Plasma normal tiene alrededor de 0,8 ng/ml reactividad de LPS (VM = valor medio, es decir, que reacciona, como si un plasma sin reactividad de LPS se complementó con 0,8 ng/ml LPS, 1 desviación estándar (DE) = 0,4 ng/ml reactividad de LPS. Los coeficientes de variación en el ensayo se encuentran por debajo del 10%.

ES 2 314 512 T3

Los enfermos con sepsis tienen un máximo de alrededor de 200 ng/ml, a veces > 200 ng/ml de LPS reactividad y/o hasta 10 µg/ml, a veces > 10 µg/ml reactividad de glucano en el plasma. El límite inferior de detección del ensayo de acuerdo con la invención es de aproximadamente 0,1 ng/ml reactividad de LPS y/o alrededor de 0,1 µg/ml reactividad de glucano en el plasma.

Sólo alrededor del 1% del LPS que se añade a un pool normal de plasma reacciona en el procedimiento de acuerdo a la invención como LPS reacciona después de la adición al 7% de albúmina humana, es decir, el plasma contiene inhibidores de LPS, LPS inhibido no es detectado en el presente procedimiento. Sólo un 10% del glucano que se añade a un pool de plasma normal reacciona en el procedimiento según la invención como glucano reacciona después de la adición al 7% de albúmina humana, es decir, el presente procedimiento no detecta glucanos neutralizados.

Las muestras de plasma debe ser analizada en forma no diluida, si es posible, porque esto imita mejor la reactividad fisiopatológica de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano.

El tiempo de incubación a temperatura ambiente (alrededor de 23°C) se acorta 3 veces, si se incuba a 37°C. Dado que el sistema de Limulus es muy sensible al calor, la temperatura de incubación no debe ser mayor de 37°C, si es posible.

Sólo los valores de la deltaA que son menos del 45% de la máxima alcanzable deltaA se evalúan.

En la siguiente lista, la mejor forma de ejecución de enfoque A se presenta. Entonces, las mejores formas de ejecución de los enfoques B y C se describen.

Determinación de la reactividad de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano (enfoque A)

10 µl de muestra

10 µl de reactivo oxidante (60 mM CT)

10 min 37°C (o 30 min RT)

10 µl de reactivo de antioxidante (230 mM metionina)

3 min RT

30 µl de reactivo de Limulus (por ejemplo Pyrochrome®, disuelto en 3,2 ml de tampón Tris)

delta A/t

Si procede, prueba con cinética lineal:

20 min RT o 40 min RT

50 µl de reactivo de linealización (750 mM arginina, pH 8,7)

delta A/t

Determinación de la reactividad basal de glucano (enfoque B)

Como enfoque A, el reactivo de antioxidante contiene además 15000 U/ml de polimixina B

Determinación de la actividad que es como la tripsina (enfoque C)

Prueba sin linealización: como enfoque A, la determinación de una lineal deltaA/t en los primeros 1-10 min RT de enfoque A y B.

Test con linealización: como enfoque A, el reactivo de linealización se añade a anterior (o si procede de hasta 3 minutos después) del reactivo de linealización, se omite la incubación de 20 minutos o 40 minutos antes de la adición del reactivo de linealización.

Si se incuba a 37°C en lugar de RT, entonces los tiempos de incubación se acortan por tres veces.

No solo la reactividad basal de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano (enfoques A, B) se puede medir sino también la reactividad de LPS y/o de lípido-A y/o de glucano puede ser medida después de que LPS o lípido-A o glucanos se han añadido a la muestra. Por tanto, la capacidad individual de la inhibición en contra de LPS y/o lípido-A y/o o glucanos es probado.

ES 2 314 512 T3

Los pacientes con baja capacidad de inhibición de LPS/lípido-A/glucano (por ejemplo, pocos anticuerpos específicos o LBP bajo o en el plasma) son más susceptibles para DIC patológica. Esto fue probado en enfoques D ó E que se describen ahora:

5 *Enfoque D (resultando en la reactividad añadida de LPS y/o de lípido-A = capacidad de inhibición de LPS y/o de lípido-A)*

10 Enfoque A se realizó con la variación de que a la muestra 0,5 partes de 1-1000, preferido 2-50, en particular 10 ng/ml LPS se agregaron, y si procede antes de la oxidación se incubó por 1-60 min RT: 100% de norma = aumento de 5 ng/ml reactividad de LPS; SD = 50%, los pacientes tienen hasta un máximo de alrededor de 1000-10000% de la norma.

15 *Enfoque E (resultando en la reactividad añadida de glucano = capacidad de inhibición de glucano)*

Enfoque A se realizó con la variación de que a la muestra 0,5 partes de 0.1-100, preferido 0.4-4, especialmente preferido 1 µg/ml zymosan A se añadieron: 100% de norma = aumento por 0,5 µg/ml reactividad de glucano; SD = 20%, los pacientes tienen hasta un máximo de alrededor de 100 - 1000% de la norma.

20 Los siguientes ejemplos describen el procedimiento con arreglo a la invención, sin limitándolo.

En los gráficos 1 a 24 se presentan los resultados de las pruebas de acuerdo con el procedimiento de la invención.

25 Ejemplo 1

Enfoque A

30 10 µl de plasma de paciente y con niveles de plasma con 0, 1, 10, 100, 1000, 10000 ng/ml reactividad de LPS se incubaron por duplicado con 10 µl 60 mM cloramina-T® en PBS durante 10 minutos a 37°C (o 30 minutos a temperatura ambiente = RT).

35 Después se añadió 10 µl 230 mM metionina en H₂O. Después de 3 min RT 30 µl de reactivo de Limulus con sustrato cromogénico para Limulus S-2834® se añadió (Pyrochrome®). La absorción se determinó después de 2 min (RT; valor basal) y después de 4 min (RT; control de la tripsina en la cinética hiperbólica). Después de 20 min (RT), el reactivo de linealización se añadió, en este caso 50 µl arginina 750 mM, pH 8,7 (concentración final de 341 mM) y la deltaA/t se determinó.

40 Este valor corresponde a la reactividad de (LPS + lípido-A + glucano) de la muestra.

Ejemplo 2

Enfoque B

45 Las condiciones de incubación eran idénticas a enfoque A, con un cambio de la medición de estándares: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/ml zymosan A en pool de plasma normal sin glucano. El reactivo de metionina contenía además 15000 U/ml de polimixina B (PMB). El valor de deltaA se determinó por un pool de plasma normal (sin zymosan A) y se restará de todos los valores de deltaA que se determinaron en el enfoque B (corrección de PMB). El valor de B, que se corrigió por PMB corresponde a la reactividad de glucano de las respectivas muestras. Los valores que se determinaron en el enfoque B, y que se corrige con PMB había que estar restado de los del enfoque A: así uno obtiene la reactividad de LPS + lípido-A de la muestra [LPS + lípido-A + glucanos] - [Glucanos] = LPS + lípido-A.

55 Ejemplo 3

Enfoque C

60 Las condiciones de incubación son idénticas a enfoque A, con la variación de que el reactivo de linealización se añadió antes de que el reactivo de Limulus y el aumento de la absorción (delta A) se determinó directamente.

Ejemplo 4

Enfoque D

65 Idénticas condiciones de incubación como en el enfoque A, con la variación de que 5 µl 10 ng/ml LPS se agregó a la muestra y se incubó durante 10 min RT antes de la oxidación.

ES 2 314 512 T3

Ejemplo 5

Enfoque E

- 5 Idénticas condiciones de incubación como en el enfoque A, con la variación de que 5 μ l 1 μ g/ml zymosan A se añadió a la muestra y se incubó durante 10 min RT antes de la oxidación.

Ejemplo 6

10

Cinética hiperbólica con el reactivo de Pyrochrome®

- 15 1 ml pool de plasma de pacientes (con citrato, que contiene 1,8 ng/ml reactividad de LPS) con coagulación normal se complementó con 0-10000 ng/ml LPS (Sigma, *E. coli* B5, gel-filtrado) o con 1 μ g/ml zymosan A (Sigma), y se incubó con 1 ml de 60 mM cloramina-T® (= CT) en PBS durante 10 minutos (37°C) en U-placas microtiter que no contenían pirógeno. 1 ml 230 mmol/l metionina en H₂O se añadió (comparable a 3,33 μ l de muestra + 3,33 μ l 60 mM de CT + 3,33 μ l de 230 mM metionina) y a los 3 min (a temperatura ambiente) 10 μ l de esta mezcla fueron incubados con 5 μ l H₂O o 10000 U/ml de polimixina B (Euro Pharma OTC, Kamen, Alemania) en H₂O y 5 μ l H₂O (enfoque 1a) o 240 mM arginina (enfoque 1b), pH 8,7 (30 mmol/l final) y 20 μ l de reactivo de Pyrochrome® a temperatura ambiente.

Los valores de absorción de la prueba realizada de acuerdo a ejemplo 6 se determinaron después de 0-44 min (RT) a 405 nm. Se determinaron los valores representados en las figuras 1-3.

- 25 Figura 1 demuestra, que el uso de 20 μ l de reactivo de Limulus (lío-filizado junto con sustrato cromogénico; cantidad de la muestra = 3,3 μ l) da un máximo deltaA de 470 mA; un delta A de 100 mA (que corresponde a cerca del 20% del máx. delta A) 26... resulta con 1,7 ng/ml reactividad de LPS en plasma después de 37 min RT, con 3,2 ng/ml reactividad de LPS después de 32 min RT, con 6,3 ng/ml reactividad de LPS después de 26 min RT, con 15,4 ng/ml reactividad de LPS después de 24 min RT, con 42,9 ng/ml reactividad de LPS después de 23 min RT, con 125 ng/ml reactividad de LPS después de 22 min RT, con 373 ng/ml reactividad de LPS después de 18 min RT.

- 35 La figura 2 muestra, que la utilización de 3,3 μ l de muestra, 3,3 μ l de oxidante, 3,3 μ l de metionina, 10 μ l H₂O o arginina y 20 μ l de reactivo de Pyrochrome® RT y de una incubación de 24 min RT resulta en una linealidad de ensayo del Limulus hasta unos 100-300 ng/ml de LPS complementado a plasma normal, correspondiente a 300 ng/ml de reactividad de LPS. Sin adición de 30 mM (final) arginina (reactivo de especificidad) la extinción de 10000 ng/ml reactividad de LPS es sólo alrededor de un 5% más bajo en comparación con el de 3333 ng/ml reactividad de LPS (● - ● determinación por duplicado), es decir, el ensayo no es inhibido a altas dosis de LPS.

- 40 Si se utiliza 30 mM arginina (reactivo de especificidad; ● - ● determinación por duplicado), entonces la reacción de Limulus es más lento, un deltaA de 200 mA después de 24 minutos RT se llega sin 30 mM arginina por adición de 100 ng/ml LPS a plasma, con 30 mM arginina por adición de 3000 ng/ml LPS a plasma. Adición de 50 μ l de 10000 U/ml PMB inhibe todas las adiciones de LPS hasta 10000 ng/ml (▲).

- 45 La Figura 3 muestra la hiperbólica cinética en este experimento en la parte baja del rango de LPS suplementado.

- 50 En la figura 4 la inhibición de LPS por polimixina B y la actividad basal propia de polimixina B en el sistema de Limulus está representado. En consecuencia, todos los valores de deltaA que se obtuvieron con polimixina B, tuvieron que ser corregidos por la resta de valor basal de deltaA del plasma sin glucano. Si el valor corregido de este modo de polimixina B se resta de la de enfoque A (véase la figura 1), la reactividad de LPS y/o de lípido-A del paciente se consigue.

- 55 La figura 4 muestra, que adición de 5 μ l 10000 U/ml PMB resulta en un delta A, de unos 70 mA después de 44 min, incluso en un pool de plasma sin glucano (○). La figura muestra, que un suplemento de LPS de hasta 371 ng/ml (▲, ■, ●, ×, Δ, □) a plasma normal es completamente neutralizado por PMB en los primeros 44 min RT de tiempo de reacción de Limulus. 1000 ng/ml de zymosan A con PMB (+) o sin PMB (◇) pueden detectarse sin injerencias; (-) muestra la diferencia de 1000 ng/ml zymosan A (ZyA) con PMB (+), menos el propio control de PMB (○).

- 60 Figura 5 muestra cómo se puede generar una cinética lineal en el desempeño de acuerdo con el procedimiento de la invención. Así por ejemplo, la cinética de enfoque 1b fue linealizada mediante la adición de 50 μ l de 750 mM arginina, pH 8,7 (concentración final de la arginina: 30 + 417 = 447 mmol/l) 23 min a RT después de la adición del reactivo de LAL.

- 65 El enfoque con 30 mM (final) arginina que está representado en la figura 5 fue linealizado con 50 μ l 750 mM arginina (●); deltaA lineales están resultando, que están aquí representados de aumento/15 min RT. Resulta una linealidad de la prueba hasta un máximo de alrededor de 300 ng/ml de reactividad de LPS reactividad. Incluso 10000 ng/ml reactividad de LPS no resulta en un efecto inhibidor de dosis altas. Adición de 5 μ l 10000 U/ml de PMB neutraliza la reactividad de LPS hasta 10000 ng/ml (▲), si el punto de linealización de tiempo es 23 min RT.

ES 2 314 512 T3

En las figuras 6 y 7 el desempeño de acuerdo con el procedimiento de la invención se presenta, utilizando una cinética hiperbólica con reactivo de Coamatic® en comparación a una cinética hiperbólica con reactivo de Pyrochrome®.

5 Por lo tanto 10 μ l pool de plasma normal, que se ha complementado con 0-100 ng/ml LPS, se incubaron con 10 μ l 60 mmol/l CT por 10 min a 37°C. 10 μ l 200 mmol/l metionina con 2000 U/ml de polimixina B (Sigma) se añadieron y a los 3 min RT 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® (Chromogenix, Mölndal, Suecia) se han añadido y la reacción se incubó a 23°C, o al 37°C.

10 Figura 6 muestra que el 20% de la máxima deltaA son alrededor de 200 mA; este deltaA se alcanza después de 40 minutos RT con + 100 ng/ml LPS, después de 50 min RT con + 50 ng/ml LPS, después de 60 min RT con + 25 ng/ml LPS, después de 70 min RT con 12,5 ng/ml LPS, después de 75 min RT con 6,3 ng/ml LPS, después de 100 minutos RT con + 3,1 ng/ml LPS, después de 120 RT con a min + 1,6 ng/ml LPS, después de 140 minutos de RT + 0,8 ng/ml LPS, después de unos 270 minutos RT con + 0 ng/ml LPS. El reactivo de Coamatic® es sustancialmente más
15 insensible para LPS que el reactivo de Pyrochrome®.

Figura 7 demuestra la influencia de la adición de ascorbato (Asc) y de metionina (Met) en el procedimiento de acuerdo con la invención. Por lo tanto, un pool de plasma normal se complementó con 0-100 ng/ml LPS. 10 μ l de ello fueron incubados con 10 μ l 60 mmol/l CT por 10 min a 37°C. 10 μ l 210 mmol/l ascorbato o 210 mmol/l metionina con
20 o sin 210 mmol/l arginina, con o sin 2000 U/ml de polimixina B se añadieron. Después de 3 min a RT 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® se añadieron y la reacción se incubó a 37°C; deltaA se midió. Uno ve que ascorbato y metionina son adecuados para neutralizar la oxidación.

La figura 7 muestra que el valor de + 0 ng/ml LPS sólo puede juzgarse correctamente después de una prolongación
25 del tiempo de incubación de más de 100 min RT. El tiempo prolongado de incubación permite una mejor determinación de la reactividad de LPS por debajo de 5 ng/ml.

Figura 8 demuestra, que 2000 U/ml PMB inhiben completamente sólo hasta alrededor de 20 ng/ml LPS-reactivi-
30 dad, que 50 ng/ml LPS a pesar de los 2000 U/ml PMB resulta en un deltaA de un adicional 100 mA, que corresponde a una reactividad de LPS + 1 ng/ml. 30 mM arginina inhibe el sistema de LAL de Coamatic® sustancialmente menor que la de Pyrochrome®.

Figuras 7 y 8 demuestran, que el reactivo de Coamatic® tiene una cinética sustancialmente más lenta que el reac-
35 tivo de Pyrochrome®, es decir, reactivo de Coamatic® contiene menos factor C, pero más sustrato cromogénico que Pyrochrome®.

En la figura 9 un procedimiento de acuerdo con el invento se presenta, en el que la reactividad de 100 ng/ml
zymosan A en un pool de plasma normal se determinó. Por lo tanto 10 μ l pool de plasma normal se complementó
40 con 0 o 100 ng/ml zymosan A y con 10 μ l 60 mmol/l CT, y la reacción se incubó durante 10 min a 37°C. Después se añadieron 10 μ l 200 mmol/l methionina con 2000 U/ml de polimixina B. A los 3 min (RT) 30 μ l de reactivo LAL Coatest® (factores de Limulus no liofilizados junto con un sustrato cromogénico) se añadieron. Después de 40 min a 37°C 75 μ l arginina 750 mM, pH 8,7 y 25 μ l 2 mmol/l CS-2834® se han añadido y el aumento de la absorción a RT se midió. Figura 9 demuestra, que 100 ng/ml zymosan se pueden medir claramente.

45 Figura 9 muestra, que el máximo incremento es de unos 1800 mA, obtenido por 25 μ l 2 mM S-2834®, que corres-
ponden a 30 μ l 1,7 mM de sustrato cromogénico (CS), es decir, en el reactivo de Coamatic® son alrededor de 0,55 mM CS y en el reactivo de Pyrochrome® son alrededor de 0,33 mM CS liofilizado junto con los factores LAL.

La figura 10 muestra los resultados de un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que 10 μ l pool de
50 plasma normal, que se ha complementado con 0-100 μ g/ml zymosan A, se incubaron con 10 μ l 60 mmol/l CT, 30 mmol/l NaHCO₃ durante 30 min a RT. Después 10 μ l 215 mmol/l metionina, 150 mmol/l arginina, pH 8,7, y 1000 U/ml de polimixina B se añadieron, y a los 3 min (RT) 15 μ l de reactivo LAL Coamatic® se añadió y delta A se determinó. La prueba en este caso es lineal de 2 μ g/ml zymosan A.

55 La figura 11 muestra los resultados de un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que 10 μ l de plasma
normal (Citrol; DadeBehring, Marburg, Alemania), que habían sido complementados con 0-1000 ng/ml LPS fueron
incubados con 10 μ l 60 mmol/l CT. Después de 30 min a RT 10 μ l 210 mmol/l arginina, 210 mmol/l ascorbato de
sodio y 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® fueron añadidos y delta A a 405 nm se midió. La figura 11 muestra la
60 cinética a temperatura ambiente.

De la figura 11 se puede ver, que un delta A de 200 mA, es decir, cerca del 20% de la máxima de delta A, se alcanza
para + 1000 ng/ml LPS después de 20 min RT, para + 500 ng/ml LPS después de 25 min RT, para + 250 ng/ml LPS
después de 30 min RT, para + 125 ng/ml LPS después de 32 min, para + 63 ng/ml LPS después de 37 min RT, para +
31 ng/ml LPS después de 45 min RT, para + 8 ng/ml LPS después de 57 min RT, para + 4 ng/ml LPS después de 72
65 min RT, para + 1 ng/ml LPS después de 80 min RT, para + 0 ng/ml LPS después de 108 min RT. Así, la cinética de LPS
con Coamatic® es considerablemente más lento que la con Pyrochrome® (figura 1), en particular para las muestras
que se han complementadas con cantidades bajas de LPS (aquí por el factor 2-3). La figura 12 muestra los resultados
de un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que 10 μ l 0-20% de albúmina humana que se han completados

con 5 ng/ml LPS se incubaron con 10 μ l 60 mmol/l CT por 10 min a 37°C. Después 10 μ l 200 mmol/l metionina y 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® y se añadieron delta A en RT se midió. Se reconoce la fuerte dependencia del test del Limulus sobre el contenido de proteína de la muestra.

- 5 Figura 12 demuestra, que el aumento de la concentración de albúmina de muestra de 0% a 1% resulta en una disminución de la reactividad de LPS a cerca de 1/5 del valor inicial. Si la concentración de albúmina se eleva al alrededor de 2%, entonces el valor inicial resulta de nuevo. Si la concentración de albúmina de la muestra sigue en aumento del 2% al 10%, luego la reactividad de LPS corresponde a 1/3 del valor inicial; un nuevo aumento de la concentración de albúmina de la muestra del 10% al 20% no resulta en un cambio de la reactividad de LPS de la muestra. Así, la albúmina estabiliza LPS (por ejemplo, contra la unión a la pared de plástico de la placa), pero al mismo tiempo inhibe la reactividad de LPS con factores de Limulus.

- 15 La figura 13 muestra los resultados de un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que 10 μ l pool de plasma normal (NPG), que había sido complementado con 0-6667 ng/ml zymosan A se incubaron con 10 μ l 60 mmol/l CT por 10 min a 37°C. Después 10 μ l 200 mmol/l metionina y 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® y se añadieron deltaA en RT se midió. Uno reconoce la linealidad (relación de concentración resultante de glucano a deltaA) de la prueba del Limulus para glucanos aquí hasta una concentración plasmática de alrededor de 2 μ g/ml de glucanos. Figuras 14 y 15 muestran los resultados de un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que 10 μ l de muestra (NPG, NPG más 3,2 mg/ml de EDTA, NPG más 70 UI/ml de heparina) que se han complementado con 0 o 10 ng/ml LPS se incubaron con 10 μ l 0-133 mmol/l CT en H₂O durante 10 minutos a 37°C. Después 10 μ l 200 mmol/l ascorbato y 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® se añadieron. Figura 14 (para plasmas suplementados con 10 ng/ml) y la figura 15 (para plasmas sin suplementación) muestran, que las concentraciones de CT de 40-80 mmol/l son óptimas para eliminar el efecto de la heparina.

- 25 La figura 14 muestra, que sin oxidación no aparece una reactividad detectable de LPS dentro de 50 min RT. 70 UI/ml de heparina en la muestra estimulan la LPS-reactividad alrededor de 5 veces si se utiliza un reactivo de oxidante con $\geq$ 60 mM CT. Como el procedimiento de acuerdo a la invención deberá imitar la reactividad fisiopatológica de LPS y/o de lípido-A y/o de glucanos con los receptores humanos de LPS y/o de lípido-A y/o de glucanos (por ejemplo, CD 14 o fosfolipasas de los monocitos), en lugar de los tubos con heparina -como según el estado de la técnica- de acuerdo con la presente invención preferentemente tubos que contienen citrato o EDTA se recomiendan para el muestreo de sangre.

- 35 La figura 15 muestra, que sin oxidación aparece sólo una reacción de Limulus de <100 mA/19 h RT en plasma normal. Además de 40-80 mM CT aumenta la reactividad más de 10 veces. Al menos 60 mM CT en el reactivo de oxidante son necesario para dar una reactividad de LPS similar en plasmas con heparina (70 UI/ml en la muestra) en comparación a un pool normal de plasma con citrato o EDTA.

- 40 La figura 16 muestra los resultados de otra invención de acuerdo a la invención, en el que 10 μ l 0-133 mmol/l CT en 100 mmol/l NaHCO₃, pH 8,5, se incubaron durante 10 min (37°C) con 10 μ l pool de plasma con coagulación normal (NPG) o el 7% de albúmina humana (Kabi, Estocolmo, Suecia), cada una de ellas ha sido completada con 0 o 10 ng/ml de LPS y/o 1000 ng/ml zymosan A (ZyA). Después 50 μ l 200 mmol/l metionina se añadieron y después de 3 min RT 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® se añadieron y delta A se determinó después de 93 min a RT. La concentración óptima de CTC en este experimento es de unos 60 mmol/l.

- 45 Figura 16 demuestra que para un pool de plasma normal, que no se había complementado y que se había complementado con LPS o ZyA, máximas reactividades de LPS o de glucano están resultando, si el reactivo de oxidante contiene de 40-80 mM CT. En el máximo del oxidante un pool de plasma normal (NPG) + LPS + ZyA tiene una reactividad de endotoxina aproximadamente de un 30% más baja que NPG + LPS. Oxidación con > 60 mM CT resulta en una disminución de la actividad de Limulus en la muestra de 7% de albúmina humana, con > 60 mM CT ZyA parece ser cada vez más destruido. LPS en plasma es destruido dosis-dependientemente por oxidación con > 90 mM CT.

- 55 Figura 17 muestra los resultados de otro procedimiento de acuerdo con la invención, en el que 10 μ l 0-133 mmol/l CT en 100 mmol/l NaHCO₃, pH 8,5 se incubaron con 10 μ l 7% albúmina humana que se ha complementado con 10 ng/ml LPS (●) o con 10 ng/ml de LPS y 1000 ng/ml de Zymosan A (■) durante 10 minutos a 37°C. 50 μ l 200 mmol/l metionina se añadieron y a los 3 min RT 30 μ l de reactivo LAL-Coamatic® fue añadido y deltaA a 405 nm se midió. La figura 17 muestra los resultados de las diferentes concentraciones de CT, más de 80 mmol/l CT inactivan endotoxina.

- 60 De la figura 17 se reconoce, que la máxima LPS-reactividad se produce por la oxidación con 20-60 mM CT, que la mayor concentración de oxidante resulta en una disminución de la reactividad de LPS, y que LPS en la muestra de la albúmina parece ser cada vez más destruido por oxidación con > 80 mM CT.

- 65 La figura 18 muestra los resultados de otros procedimientos, en el que n = 24 plasmas con EDTA de pacientes no seleccionados se analizaron por medio de la prueba del LAL Coamatic® y fueron tratadas ya sea con calor (10 veces diluidas con H₂O, 15 min a 75°C) o con 60 mmol/l CT. Se reconoce de la figura 18, que los procedimientos generan diferentes resultados de reactividad (tratamiento por calor: 1,8 ng/ml LPS + - 1,6 ng/ml; tratamiento por CT: 2,8 ng/ml + - 1, 6 ng/ml; el factor de correlación r = 0.210).

ES 2 314 512 T3

La figura 19 muestra los resultados de la reactividad de otros procedimientos, en la que 5 μ l 0 y 10 ng/ml LPS se han añadido a las muestras y que se pusieron a prueba en el ensayo oxidativo con el reactivo de Coamatic®. Inicial 2,8 $\pm$ 1,6 ng/ml LPS fueron después de adición de LPS 6,2 ng/ml $\pm$ 3,8 ng/ml, el factor de correlación $r = 0,574$.

La figura 20 muestra los resultados de otros procedimientos, en los que la adición de 5 μ l 10 ng/ml LPS resulta en + 5,8 - 4,6 ng/ml después de inicial 1,5 $\pm$ 1,1 ng/ml LPS y después del tratamiento por calor de las muestras, el factor de correlación es $r = 0,024$. Este factor de correlación es sustancialmente menor que el de la oxidación de las muestras ($r = 0,574$), es decir, existe una extrema variación interindividual en la recuperación completa de LPS y cuando se realizan pruebas con el tratamiento por calor (fuerte desnaturalización), en contraste con el método de oxidación.

La figura 21 muestra los resultados de la reactividad otros procedimientos, en el que 10 μ l NPG (pool normal de 12 plasmas), que había sido complementado con 0-10 ng/ml LPS se incubaron con 10 μ l 60 mmol/l CT por 10 min (37°C). Después 10 μ l 210 mmol/l ascorbato, 210 mmol/l arginina, pH 8,7, se añadió. Después de 3 min a RT 30 μ l reactivo de LAL (Coatest®, Chromogenix, que se disolvía en 1,4 ml de H₂O; sin sustrato cromogénico) se han añadido, y después de 0-90 min a RT 75 μ l 750 mmol/l arginina, pH 8,7, y 30 μ l 2 mmol/l Ile-Glu-Gly-Arg-pNA se añadieron y el lineal deltaA a 405 nm fue determinado. De la figura 21 se reconoce, que el punto óptimo de tiempo para linealización en este enfoque es de 45 min RT (la curva de calibración de LPS es lineal hasta 10 ng/ml LPS). Además, la figura 21 muestra que los tiempos de incubación de los factores de Limulus > 60 min RT incluso resultan en una disminución de la reactividad de LPS (◆, ▲). Esto se debe a la destrucción propia de los factores de Limulus, presencia de sustrato cromogénico (como en la cinética hiperbólica antes de la adición del reactivo de linealización) protege en contra de este.

Figura 22 muestra los resultados de otros procedimientos, en el que 10 μ l NPG (de 12 plasmas normales) complementado con 0-100 ng/ml LPS o con 0-100 μ g/ml zymosan A se incubaron con 10 μ l de 60 mmol/l CT durante 10 minutos a 37°C. Después 10 μ l 210 mmol/l arginina, 210 mmol/l ascorbato sin (LPS + glucanos) o con 2000 U/ml de polimixina B (prueba de glucanos; ensayo de ZyA) y 30 μ l de reactivo LAL Coamatic® se añadieron y deltaA fue determinado. Figura 22 demuestra, que se produce aquí una linealidad hasta 2 μ g/ml zymosan A, o hasta 100 ng/ml LPS. Las concentraciones de LPS > 40 ng/ml no podían ser completamente inhibidas por 2000 U/ml de polimixina B.

Figuras 23a-c muestran los resultados de otros procedimientos, en la que 200 μ l NPG (○), NPG + 50 ng/ml LPS (■) o + 91 ng/ml LPS), NPG +50 μ g/ml ZyA (▲) fueron incubados con 200 μ l 60 mmol/l CT en H₂O durante 10 minutos a 37°C. 20 μ l de ello fueron incubados con 10 μ l 210 mmol/l arginina, 210 mmol/l ascorbato y 0-250000 U/ml de polimixina B a 37°C y se determinó deltaA. De las cifras 23a-c se puede reconocer, que la polimixina B en sí estimula el sistema de Limulus.

La figura 24 muestra un experimento de comparación del procedimiento según el estado de la técnica con el tratamiento de 75°C (15 min) de las muestras con el procedimiento de acuerdo con la presente invención con oxidación de las muestras por 60 mM cloramina-T® (10 min, 37°C). Aquí 7,5% de albúmina humana (Kabi, Estocolmo, Suecia), que basalmente contenía 0,5 μ g/ml de zymosan A, se ha completado con 0-10000 ng/ml LPS (*E. coli* 0111: B4; purificado por filtración con gel; producto L 3012: Sigma, Deisenhofen, Alemania) o con + 0-100 μ g/ml de zymosan A se analizaron de la siguiente manera:

A. Tratamiento por calor

20 μ l de la muestra fue 10 veces diluida con agua dest. y se incubó durante 15 min a RT o a 75°C (baño de agua). Después 20 μ l de muestra así tratada se incubó por duplicado con 20 μ l de reactivo LAL (Pyrochrome®) a RT en el delta A a 405 nm se determinó a través de un fotómetro que funciona con placas microtiter (Milenia-DPC, Los Angeles, EE.UU.). 24 a,b demuestran los siguientes enfoques:

+ 0 ng/ml LPS (○), + 0,1 ng/ml LPS (Δ gris), +1 ng/ml LPS (gris ◆), +10 ng/ml LPS (gris □), +100 ng/ml (●), +1000 ng/ml LPS (▲), +0,1 μ g/ml ZyA (Δ), +1 μ g/ml ZyA (◇), +10 μ g/ml ZyA (□), +100 μ g/ml ZyA (X). Uno ve que +1000 ng/ml LPS después del tratamiento por el calor actúa como +0,1 ng/ml LPS en RT (Fig. 24a), es decir, el 99,99% del LPS activo fue inactivado por el tratamiento por calor (Fig. 24b). Zymosan A es resistente al calor.

B. Tratamiento de oxidación

5 μ l de muestra se incubaron por duplicado con 5 μ l de PBS o 60 mM cloramina-T® en PBS durante 10 minutos a 37°C (baño de agua). Después 5 μ l de 230 mM metionina en agua dest. se añadieron y a los 3 min RT 15 μ l de reactivo LAL (Pyrochrome®) se añadió y el delta A a 405 nm (RT) se determinó. Uno reconoce que tanto la reactividad de LPS (Fig. 24c) como la reactividad de zymosan es resistente a la oxidación (Fig. 24d).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar el contenido de lipopolisacárido y/o de lípido-A y/o de glucano en líquidos biológicos a un valor de pH entre 6 y 10, que comprende

A) el tratamiento de la muestra con al menos un oxidante del grupo de los generadores de oxígeno singlete,

B) la adición de al menos un factor de amebocitos de *Limulus* a la muestra oxidada, y

C) la determinación de la activación de al menos un factor de amebocitos de *Limulus*.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que se utiliza como oxidante cloramina, especialmente cloramina-T® (N-cloro-toluol-sulfonamida).

3. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que el oxidante se añade a la muestra en una cantidad de 15-200 μ moles, en particular 30-120 μ moles, especialmente preferido 50-70 μ moles por ml de líquido de la muestra.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que después de la actuación de la oxidación la cantidad restante de oxidante es inactivada por adición de un antioxidante, en particular mediante la adición de un inhibidor de oxígeno singlete, de preferencia ascorbato o metionina.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que la activación de por lo menos uno de los factores del sistema de *Limulus* es determinado por la medición de la cantidad de cromóforo que se genera por el sistema de *Limulus* de un compuesto cromogénico que puede estar degradado por un factor activado de *Limulus*.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que el líquido biológico es sangre, productos de sangre, licor, orina, saliva, lavado broncoalveolar, ascites, efusiones pericárdicas o pleurales, leche, líquidos de tejidos, líquido linfático, y en particular plasma.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que se utiliza un líquido biológico que contiene heparina que se ha completado con al menos un inhibidor de la heparina antes de la prueba o durante de la prueba.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que se utiliza un líquido biológico que no contiene heparina o que contiene un máximo de 1 UI/ml de heparina y que contiene citrato o EDTA.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, con las características, que la cinética del procedimiento es linealizado antes de o durante la ejecución del paso c) con un reactivo que contenga al menos un compuesto de guanidina y/o un agente caotrópico.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por lo tanto, que como compuesto de guanidina arginina y/o como agente caotrópico un catión de un alcali-metal y/o un catión de un tierra-alcali-metal se utiliza.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por lo tanto, que este se realiza para diferenciar entre la reactividad de LPS y lípido-A y glucanos y reactividad de glucanos en presencia y en ausencia de un inhibidor de LPS, y que las reactividades, que se han determinado en los dos enfoques de la prueba se restan las unas de las otras, a fin de evaluar la reactividad causada por LPS y/o lípido-A.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** por lo tanto, que se utiliza la polimixina B como inhibidor de LPS.

13. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por lo tanto, que el líquido biológico antes o durante el paso a) se diluye con albúmina (humana).

14. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por lo tanto, que el líquido biológico tiene una concentración de proteínas de 30-100 g/l, sobre todo de 60-90 g/l.

15. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por lo tanto, que una determinada cantidad de LPS y/o lípido-A se añade a la muestra y el contenido de lipopolisacárido está determinado a evaluar la capacidad de inhibición de LPS y/o lípido-A.

16. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por lo tanto, que una determinada cantidad de glucano se añade a la muestra y el contenido de glucano está determinado a evaluar la capacidad de inhibición de glucano.

Fig. 1

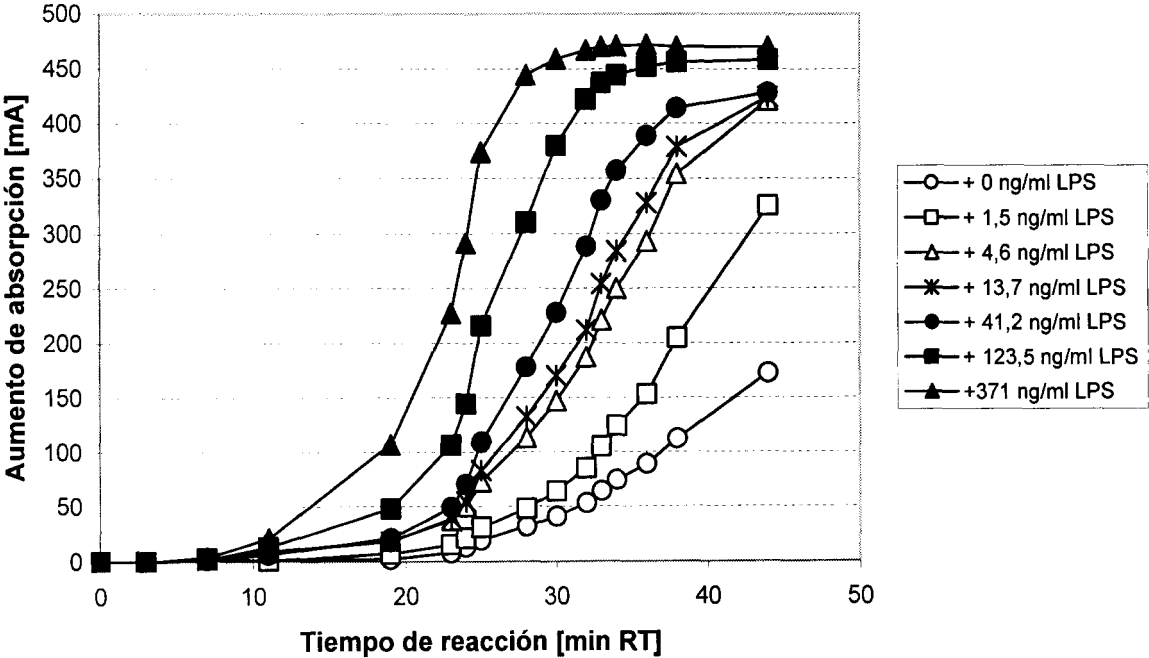


Figura 1

Fig. 2
Leyenda como en Fig. 3

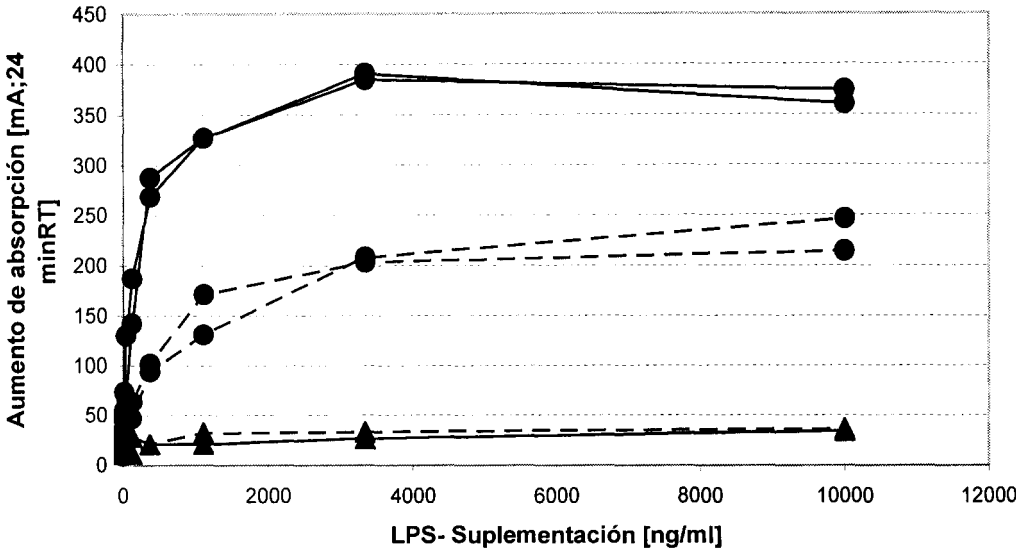


Figura 2

Fig. 3

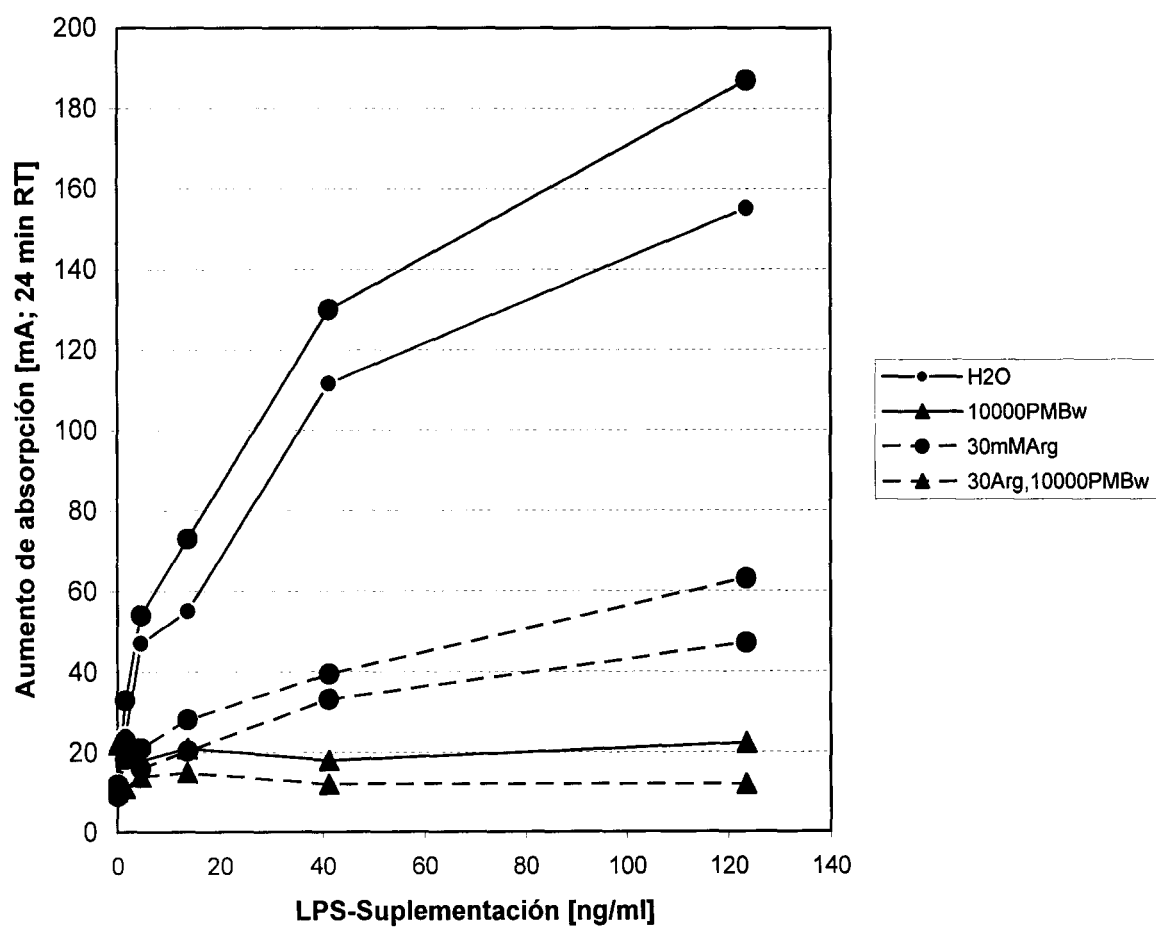


Figura 3

Fig. 4

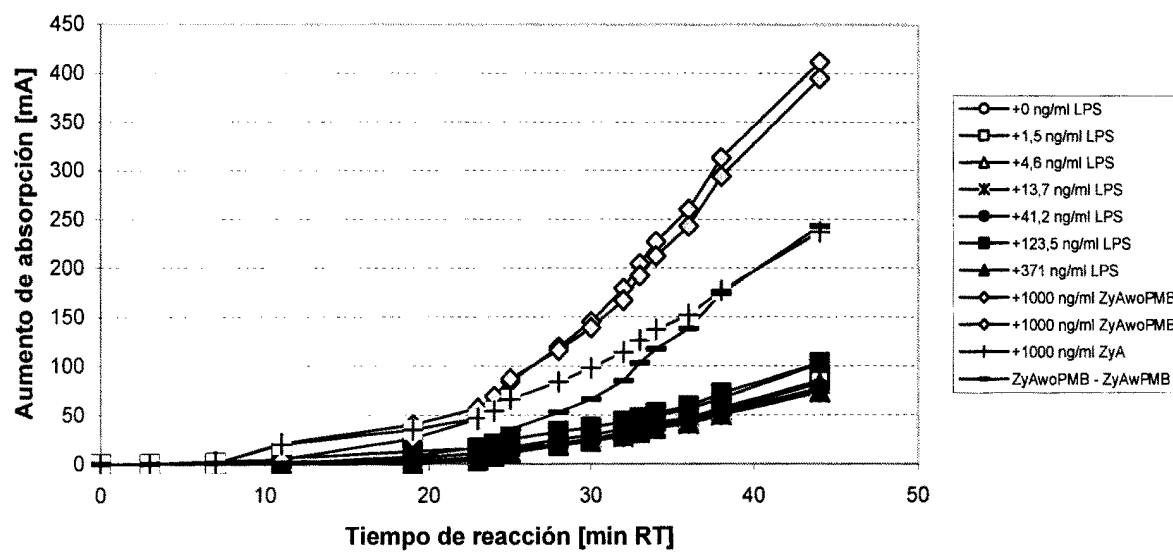


Figura 4

Fig. 5

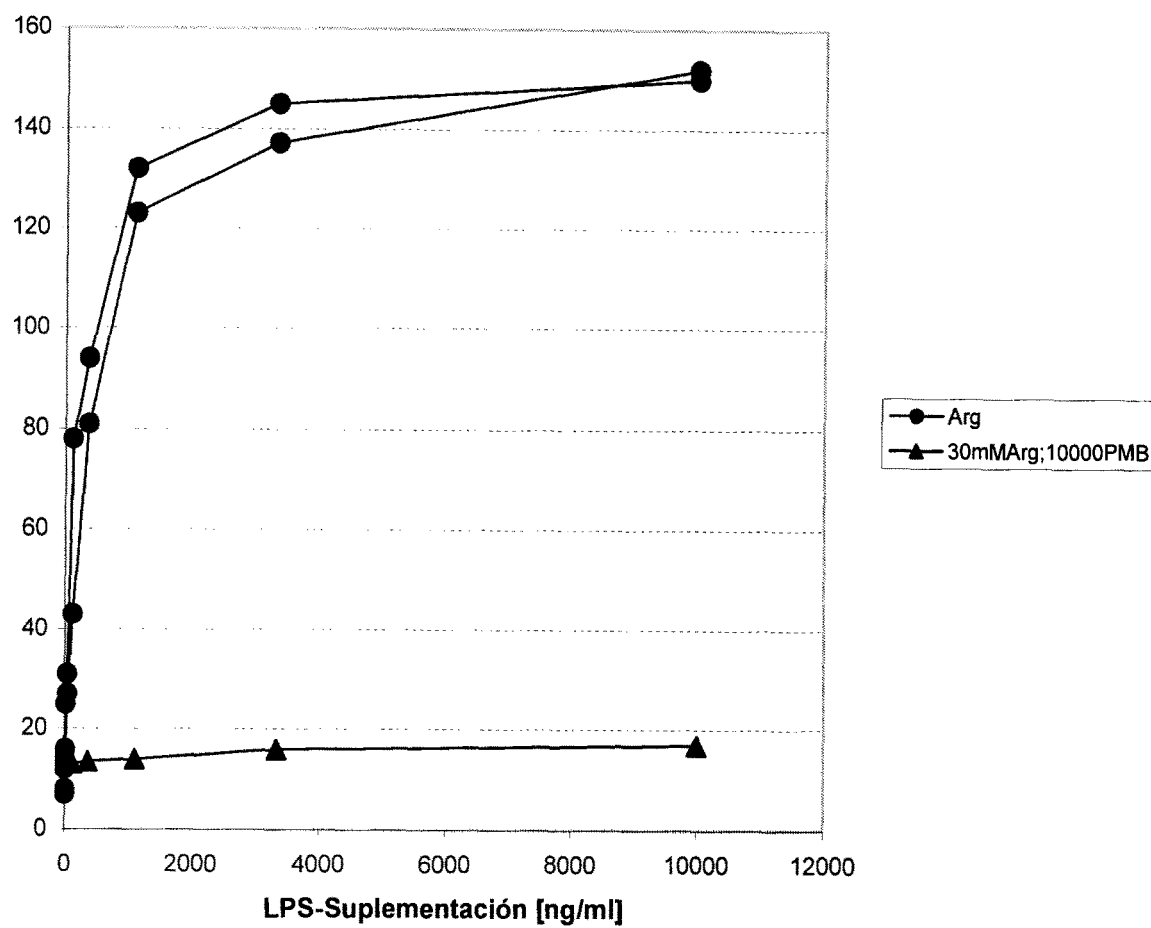


Figura 5

Fig. 6

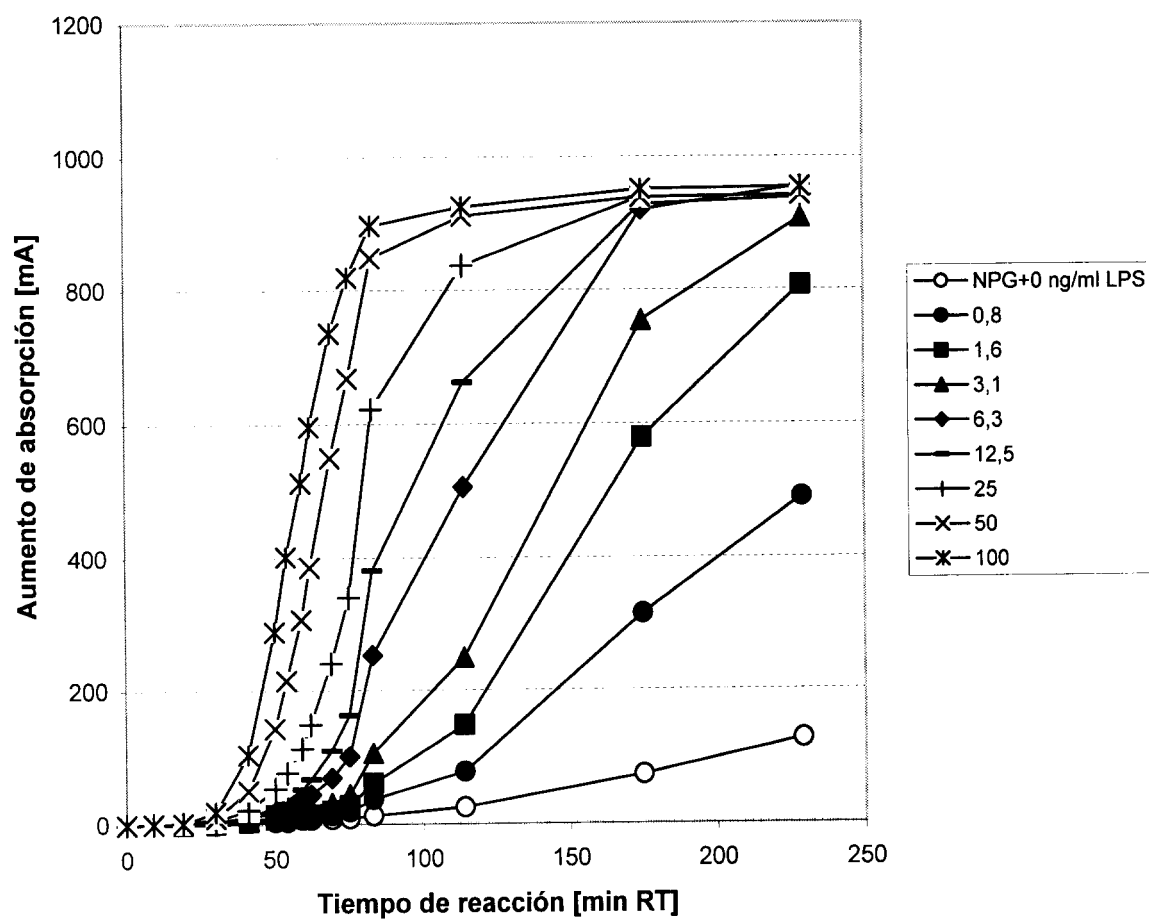


Figura 6

Fig. 7
Leyenda como en figura 8

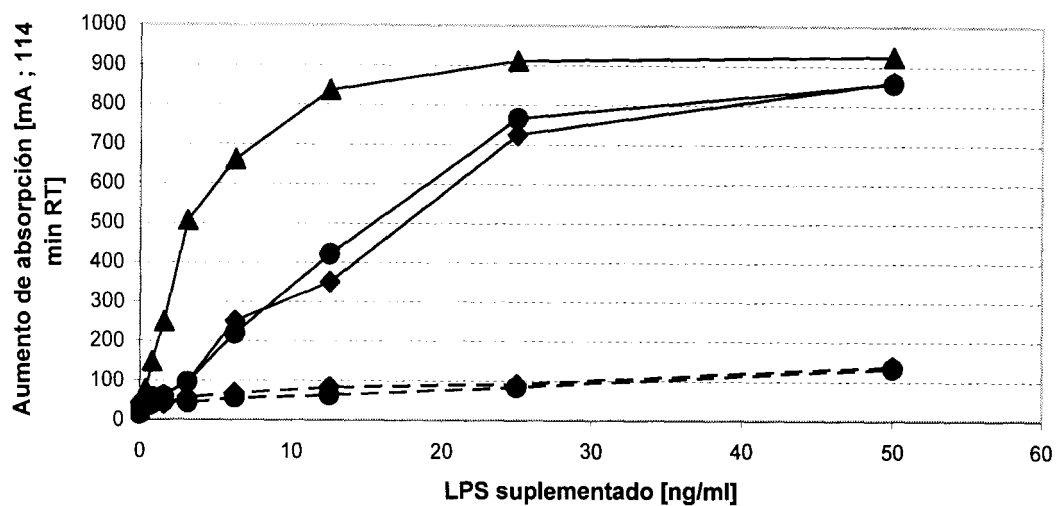


Figura 7

Fig. 8

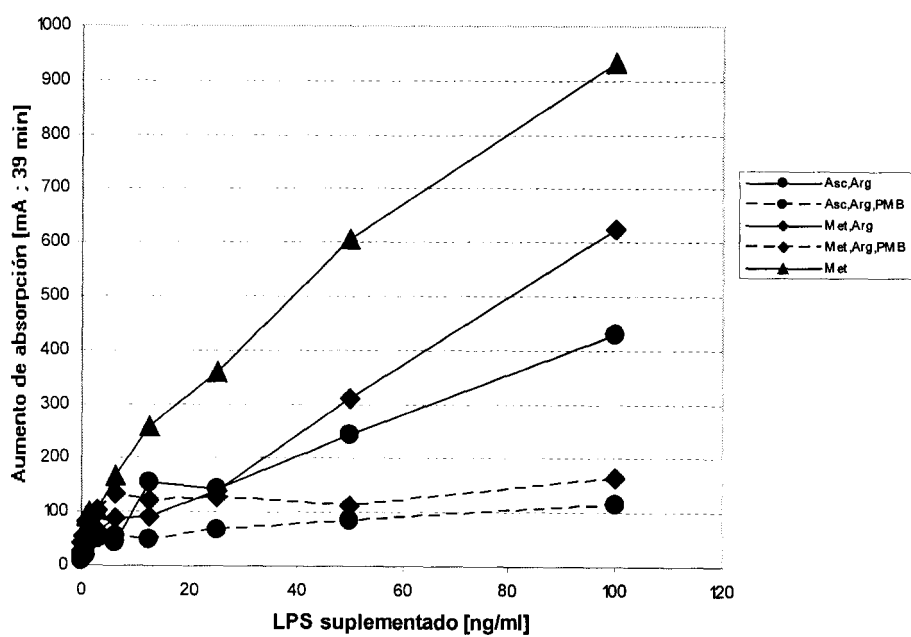


Figura 8

Fig. 9

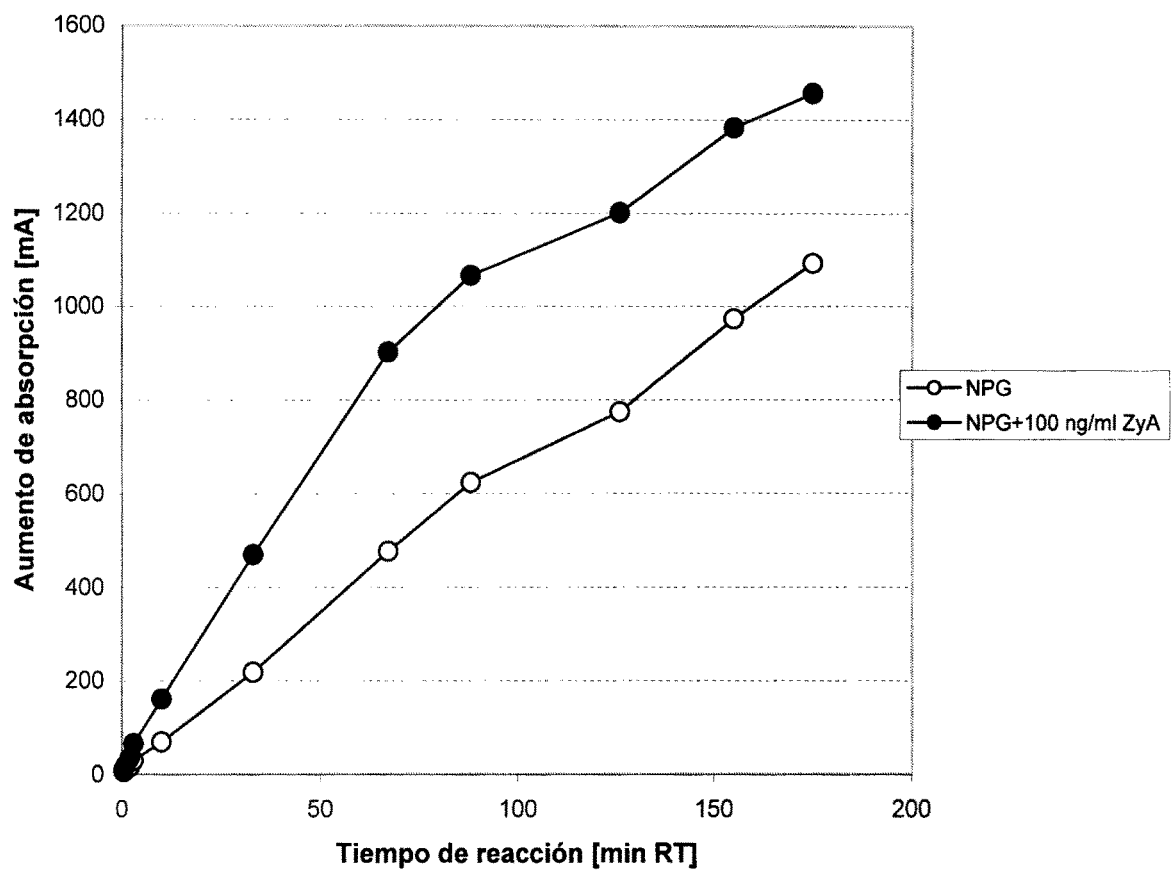


Figura 9

Fig. 10

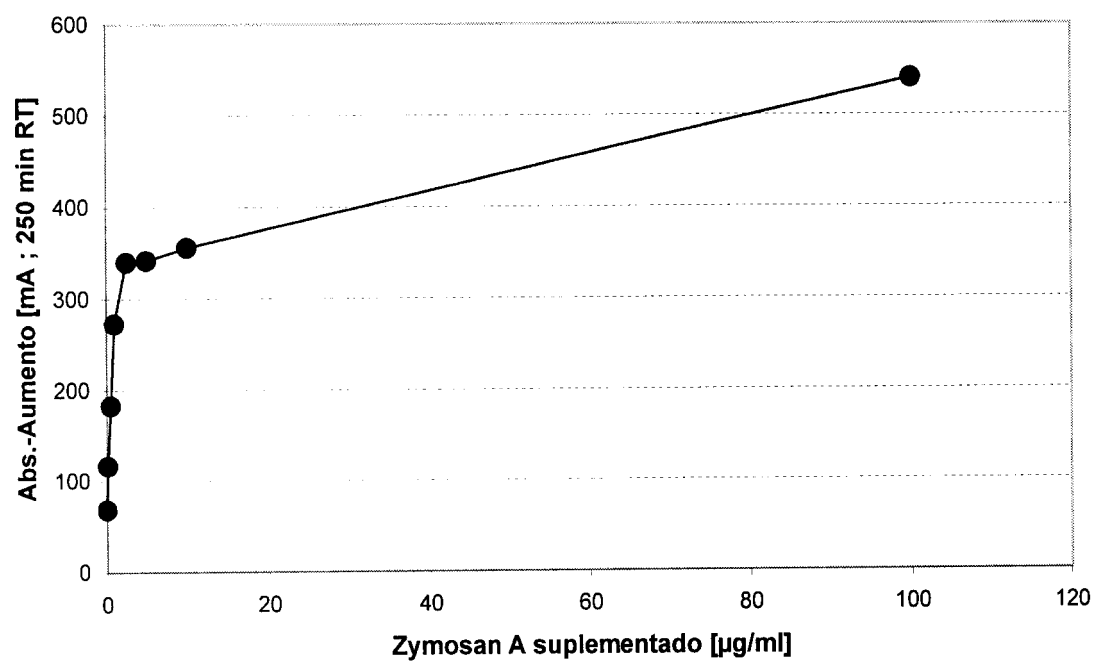


Figura 10

Fig. 11

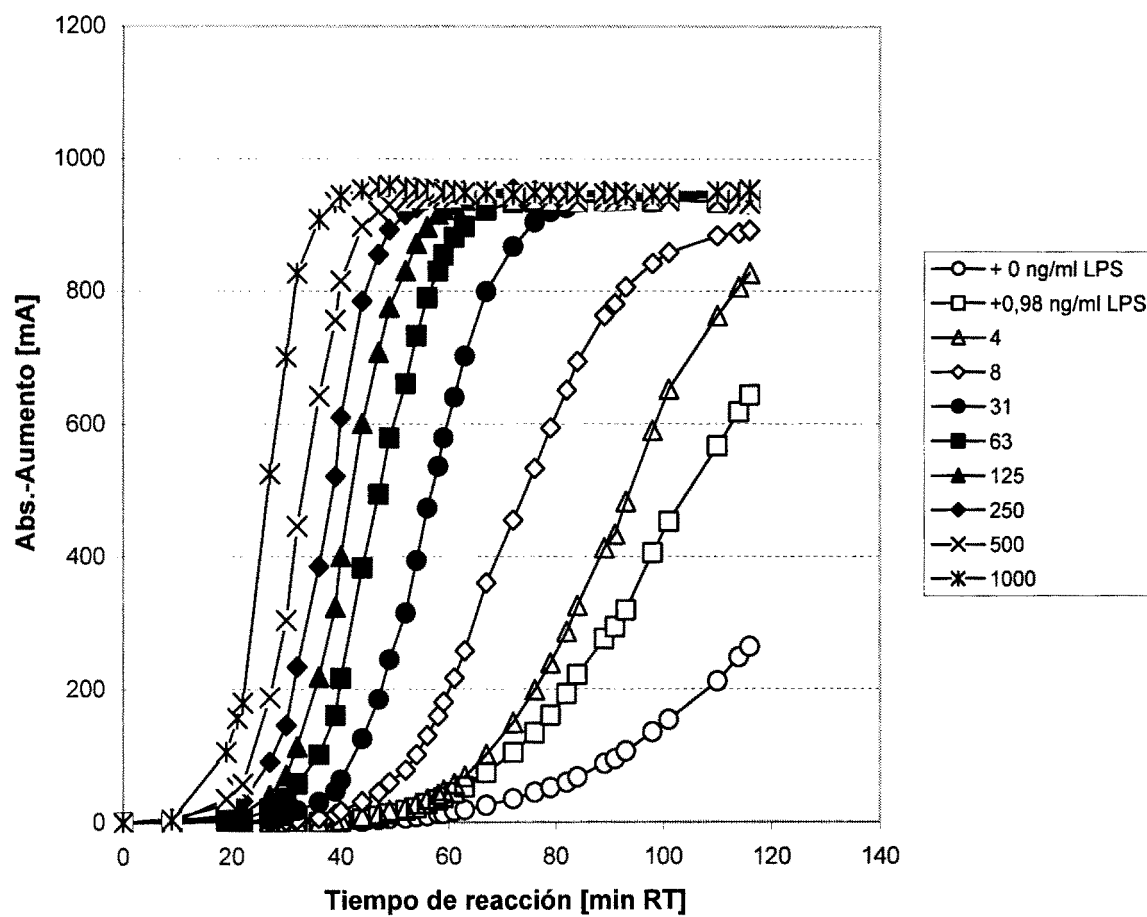


Figura 11

Fig. 12

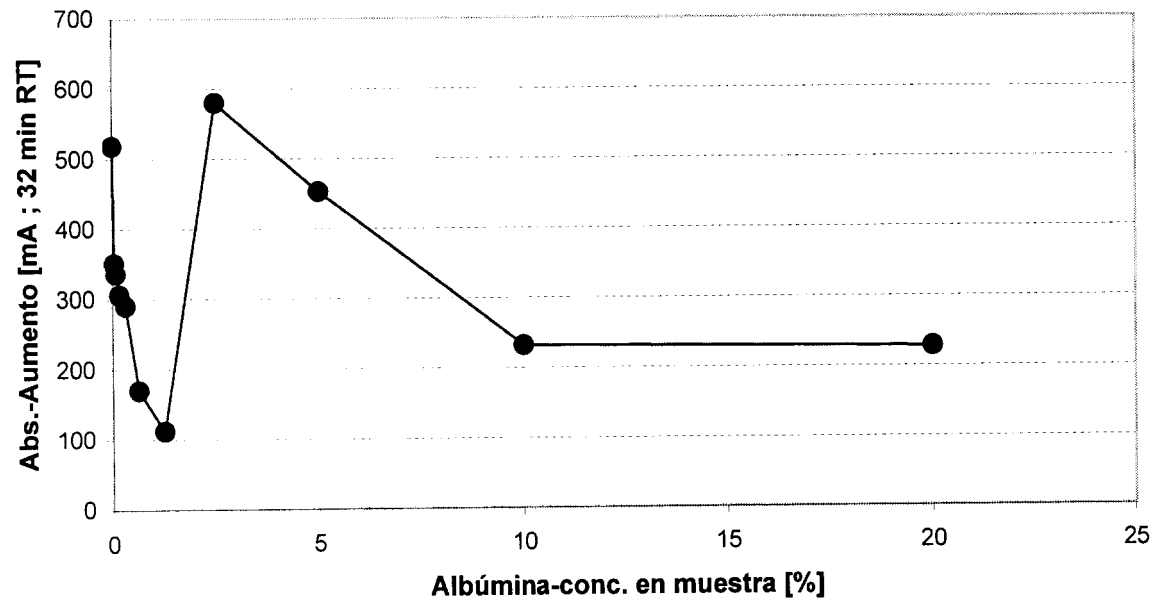


Figura 12

Abb. 13

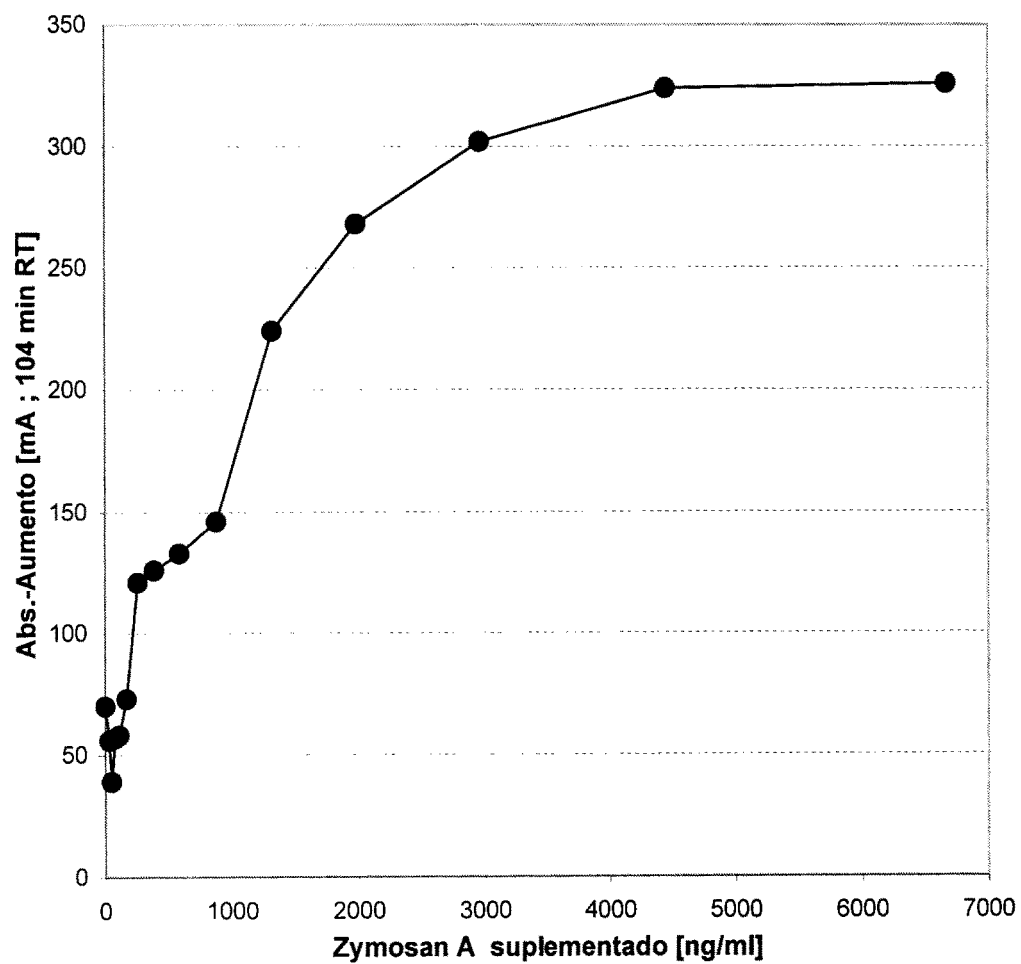


Figura 13

Fig. 14

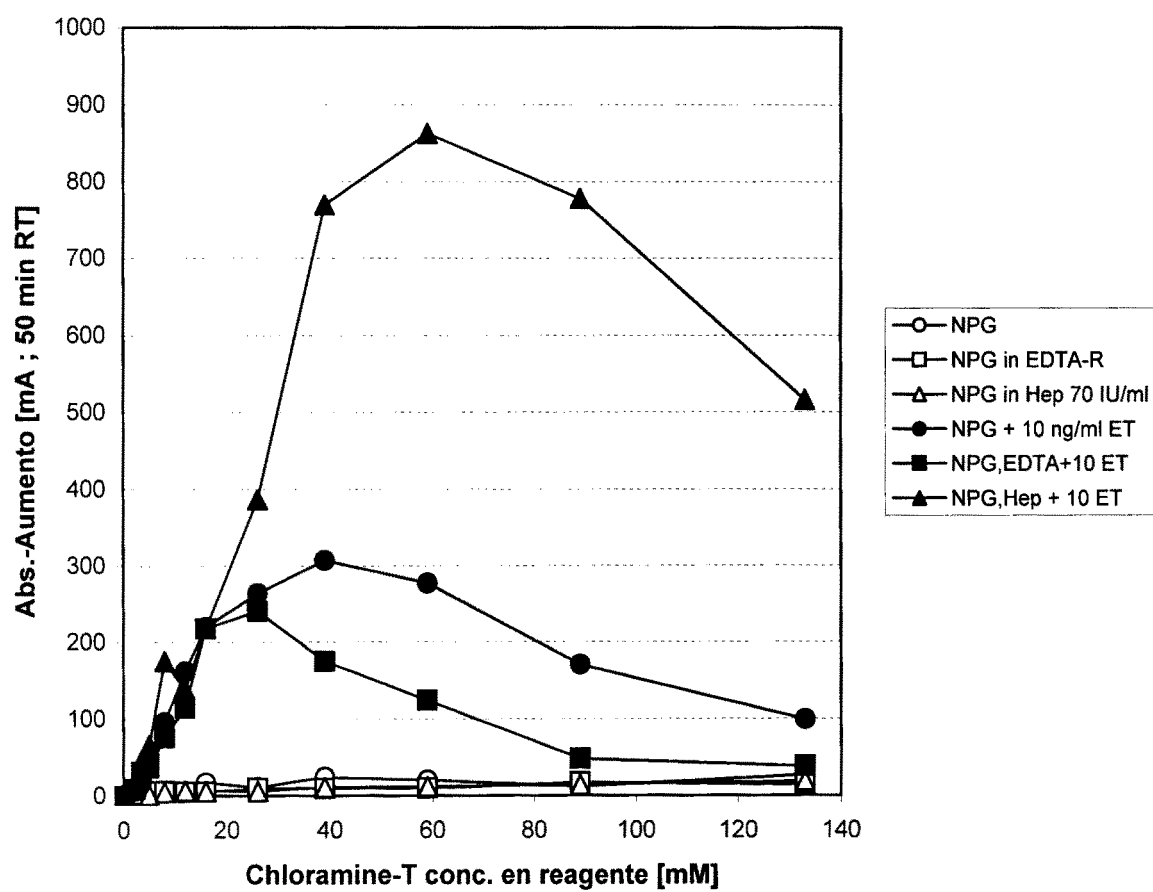


Figura 14

Fig. 15

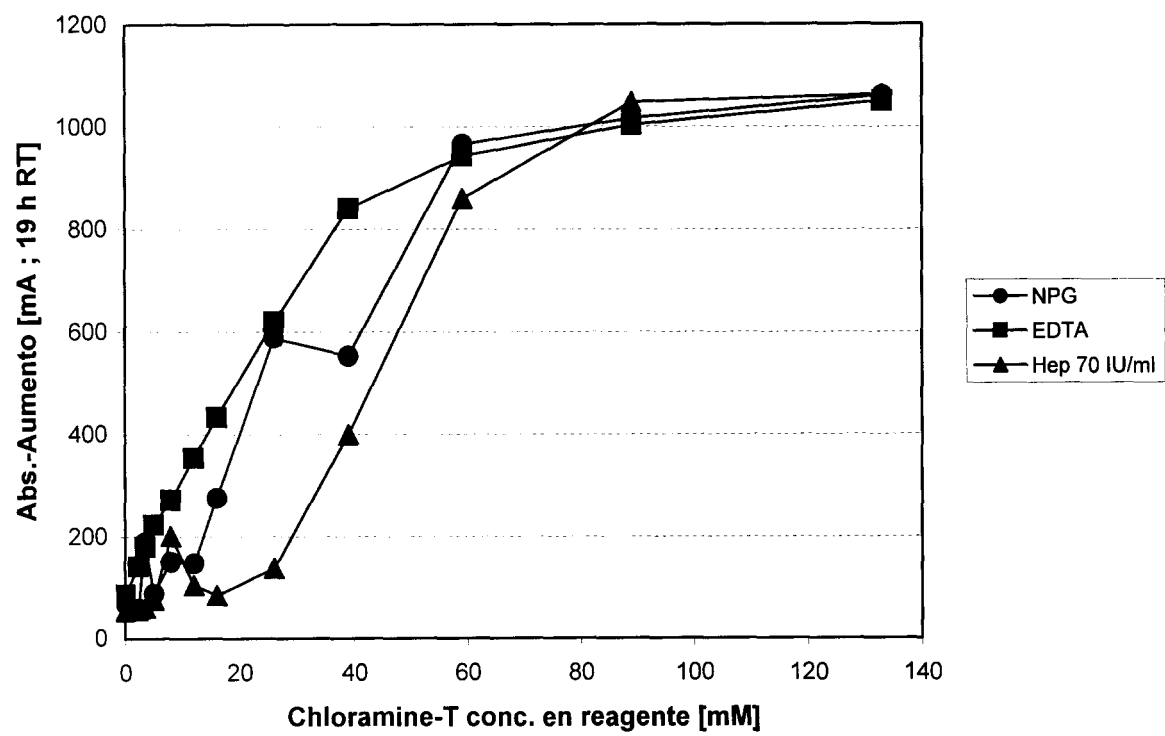


Figura 15

Fig. 16

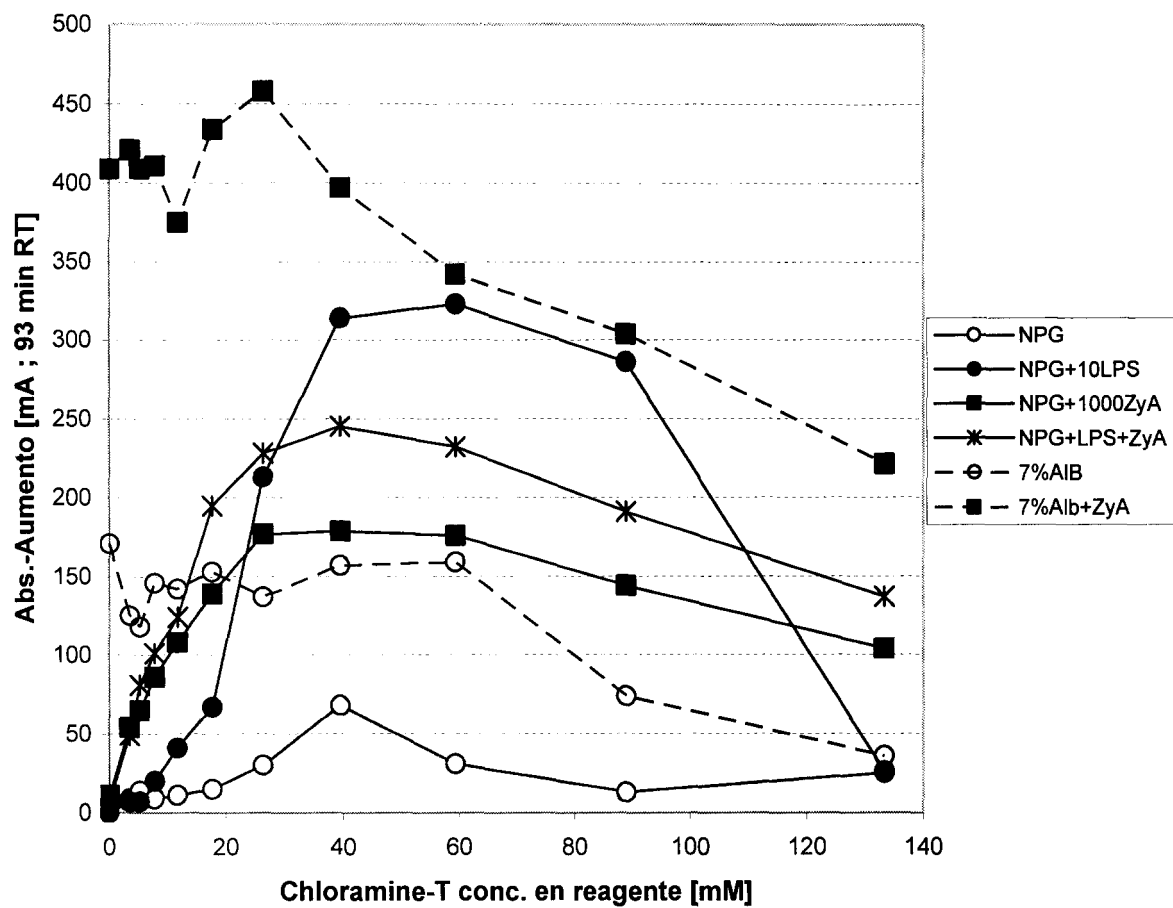


Figura 16

Fig. 17

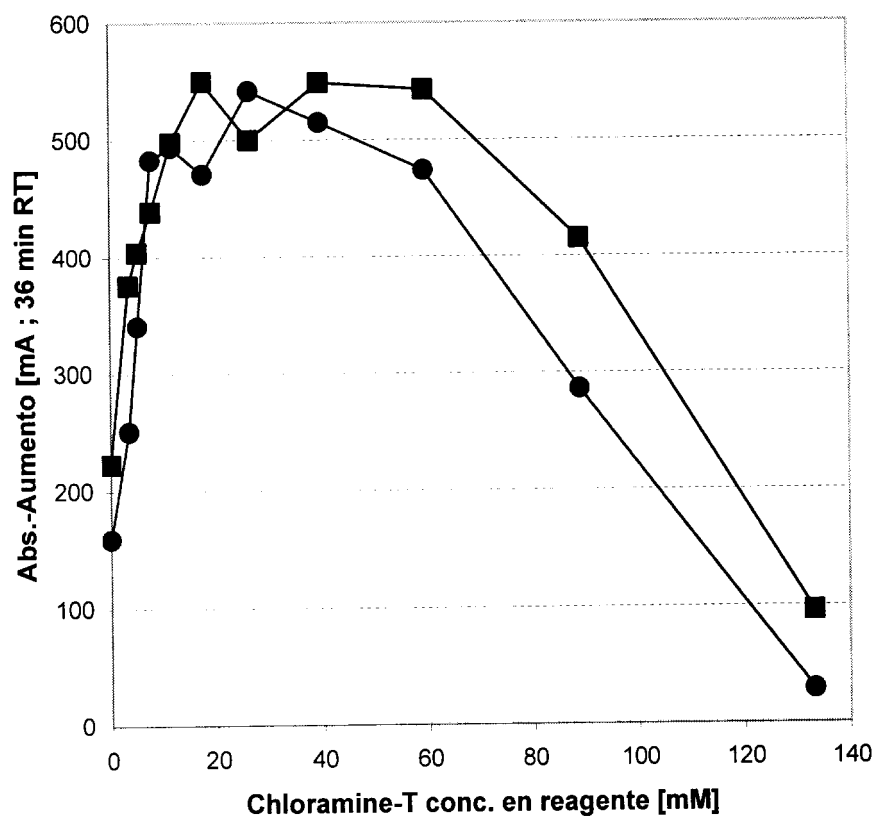


Figura 17

Fig. 18

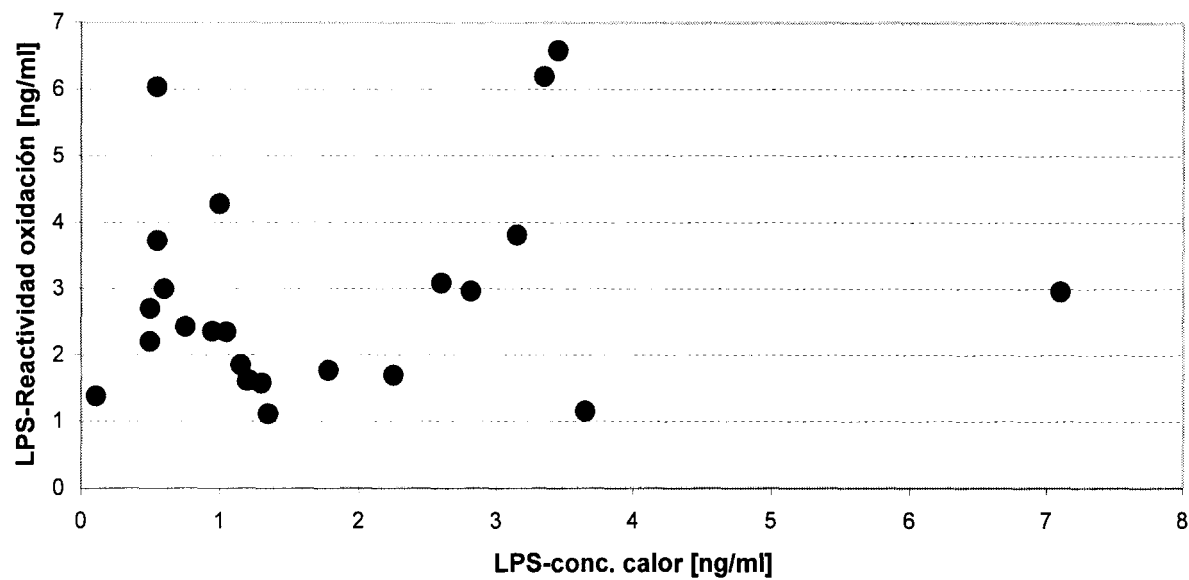


Figura 18

Fig. 19

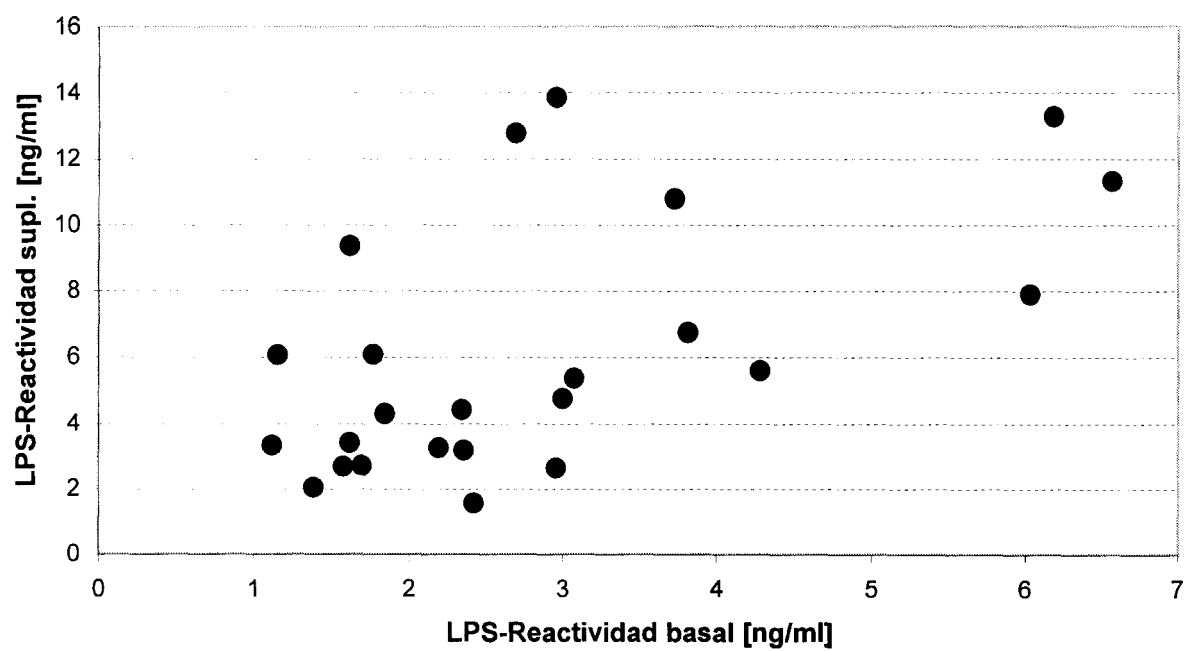


Figura 19

Fig. 20

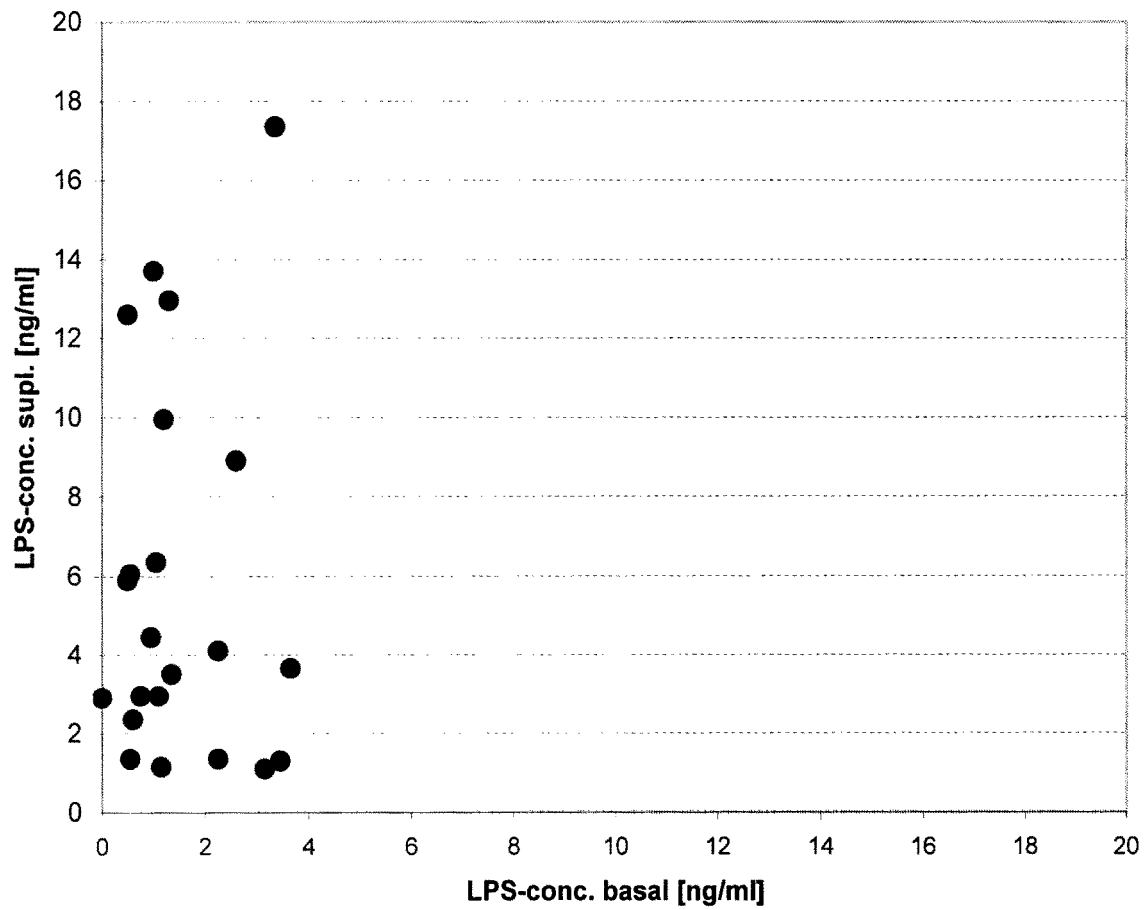


Figura 20

Fig. 21

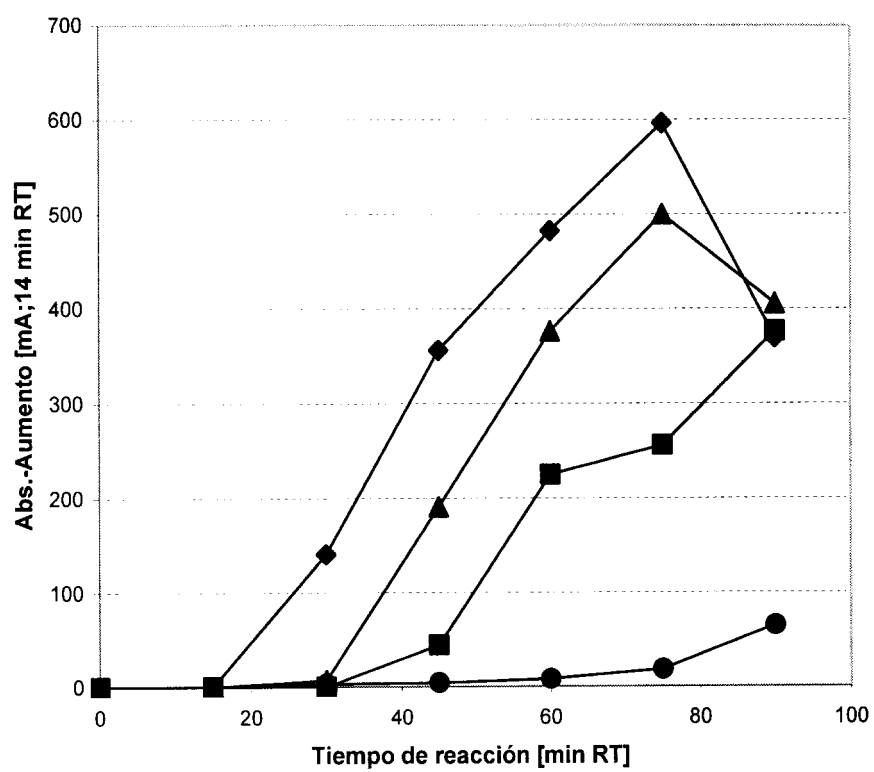


Figura 21

Fig. 22

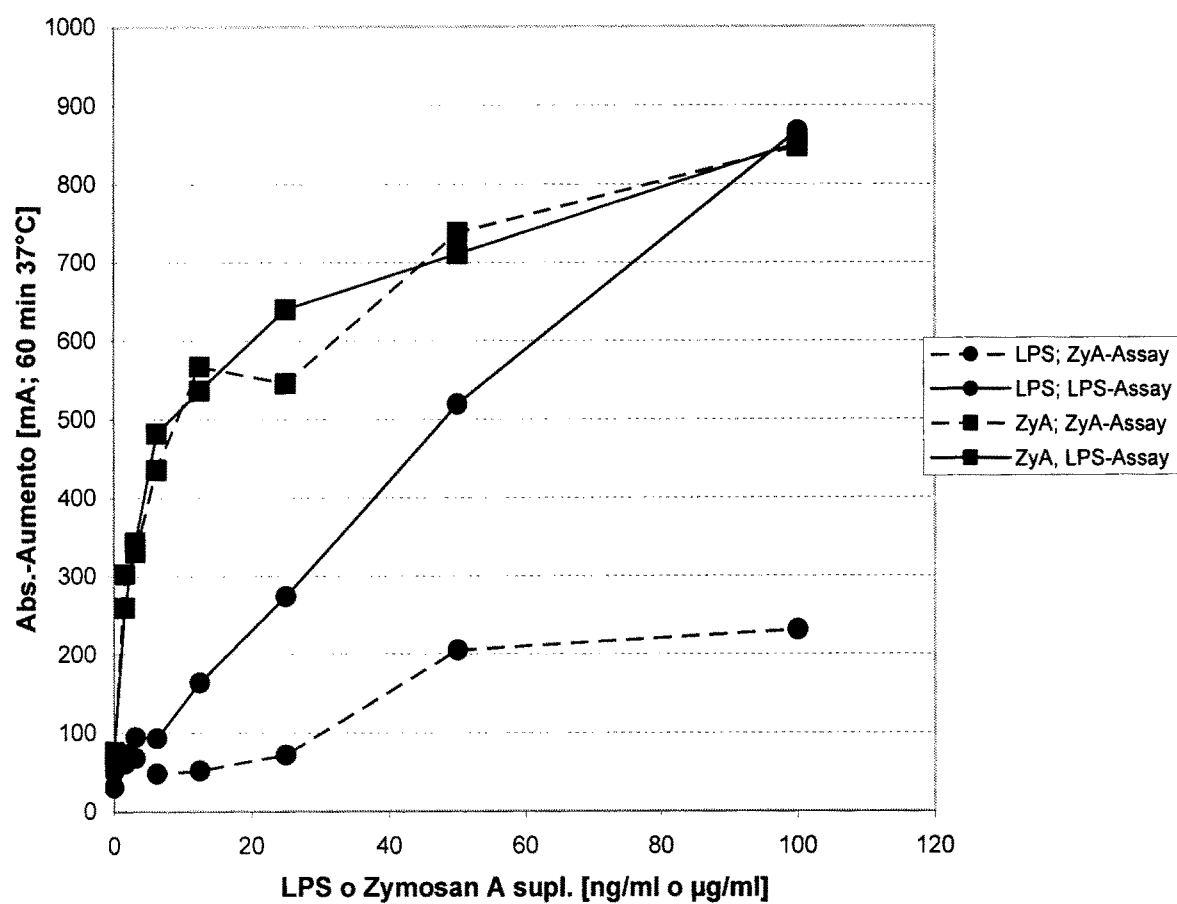


Figura 22

Fig. 23a

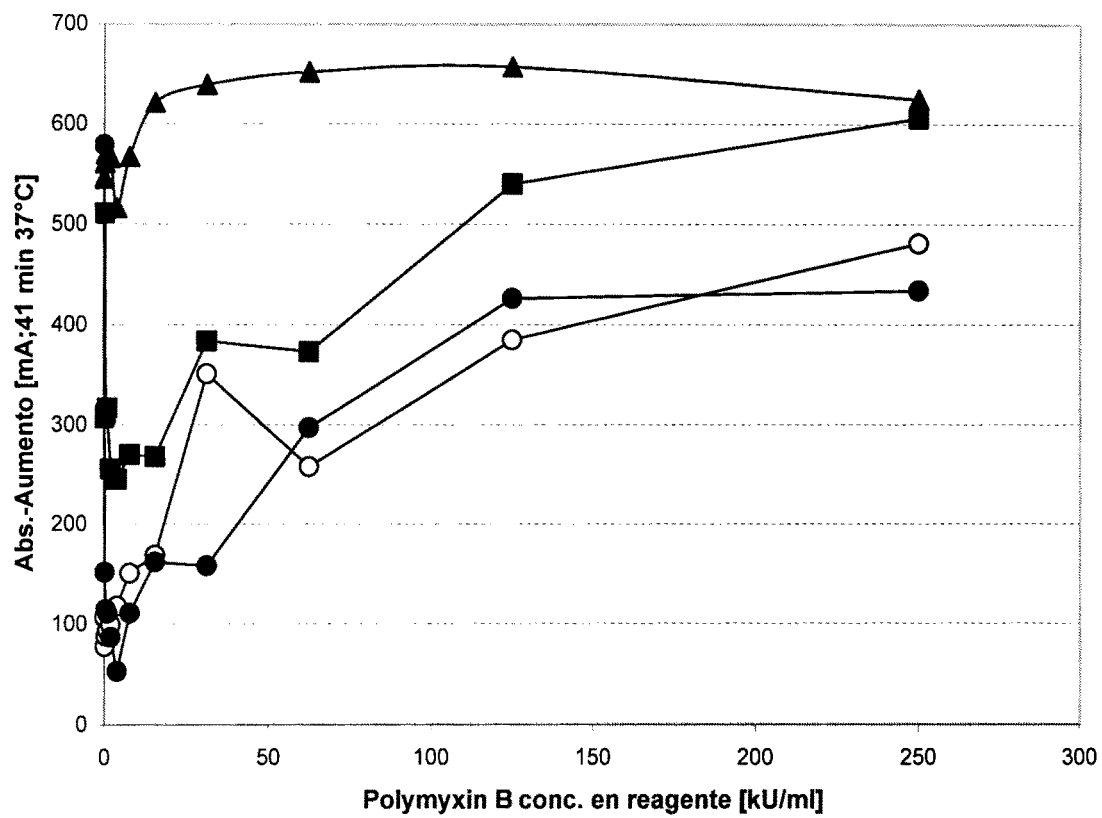


Figura 23a

Fig. 23b

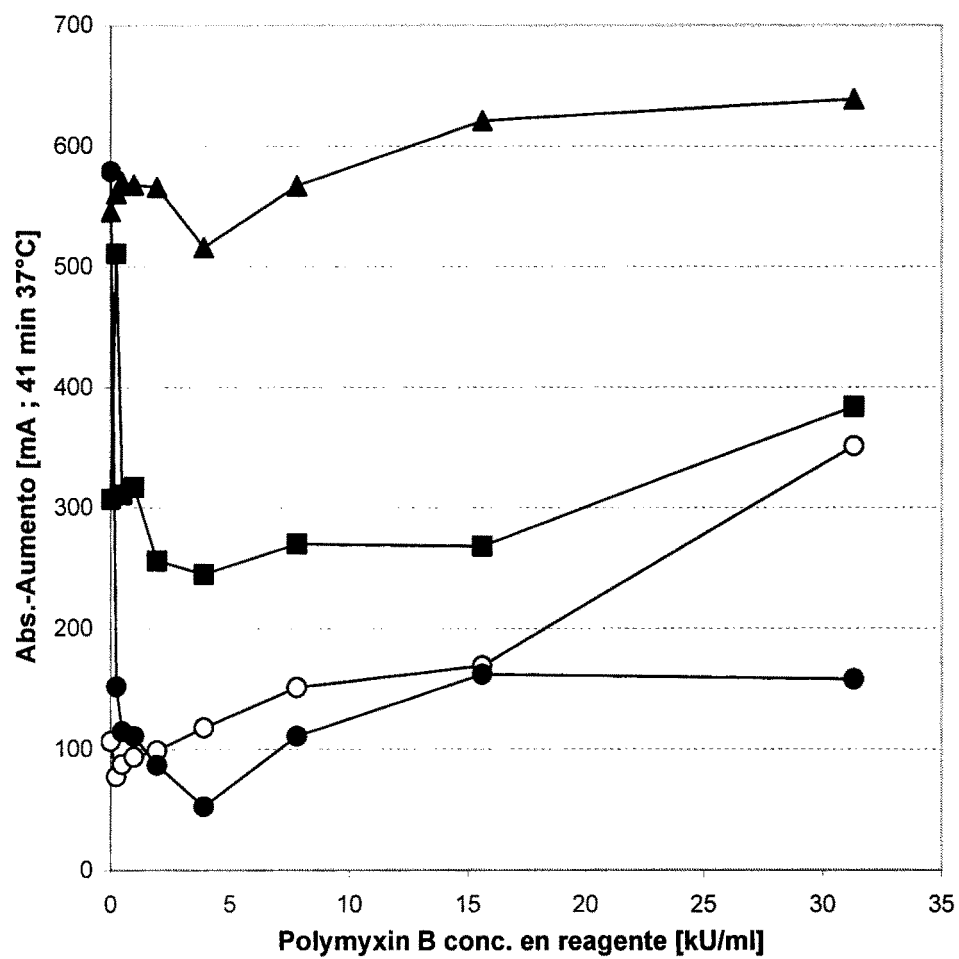


Figura 23b

Fig. 23c

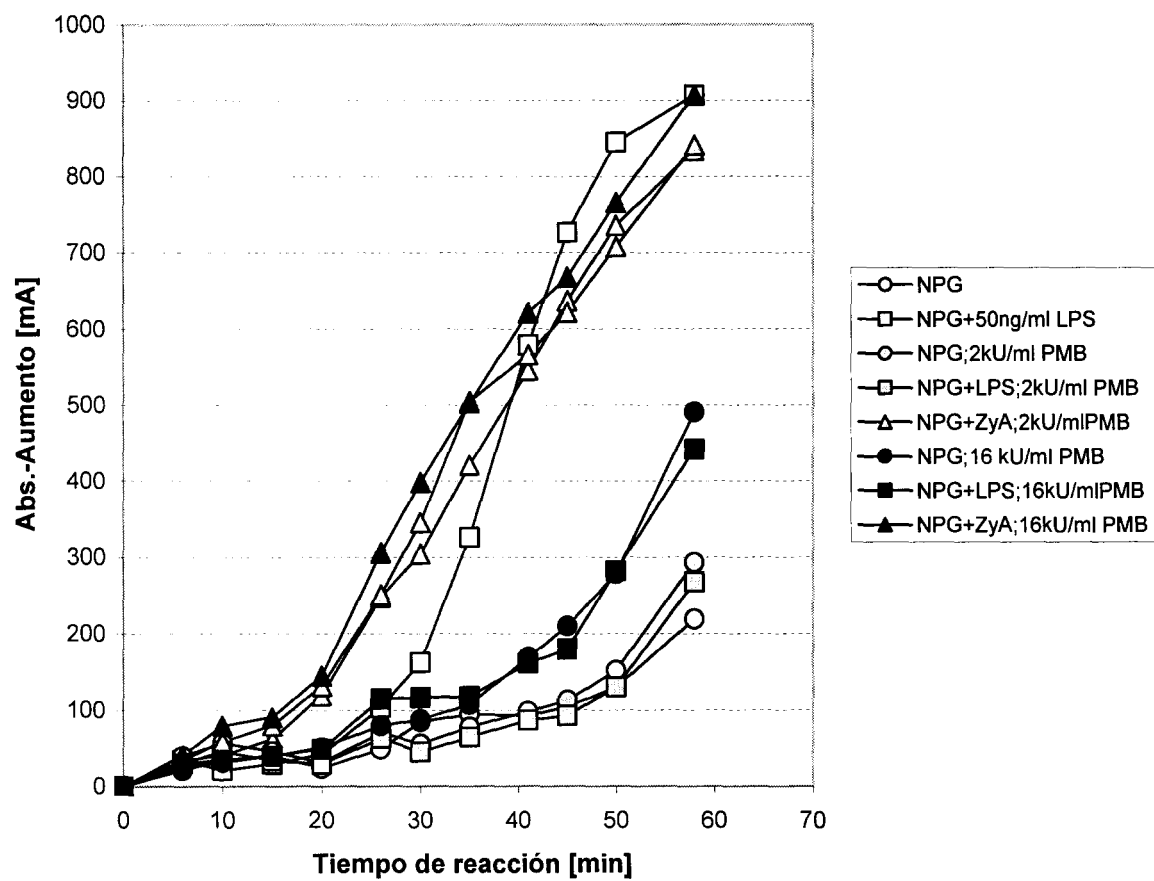


Figura 23c

Fig. 24a

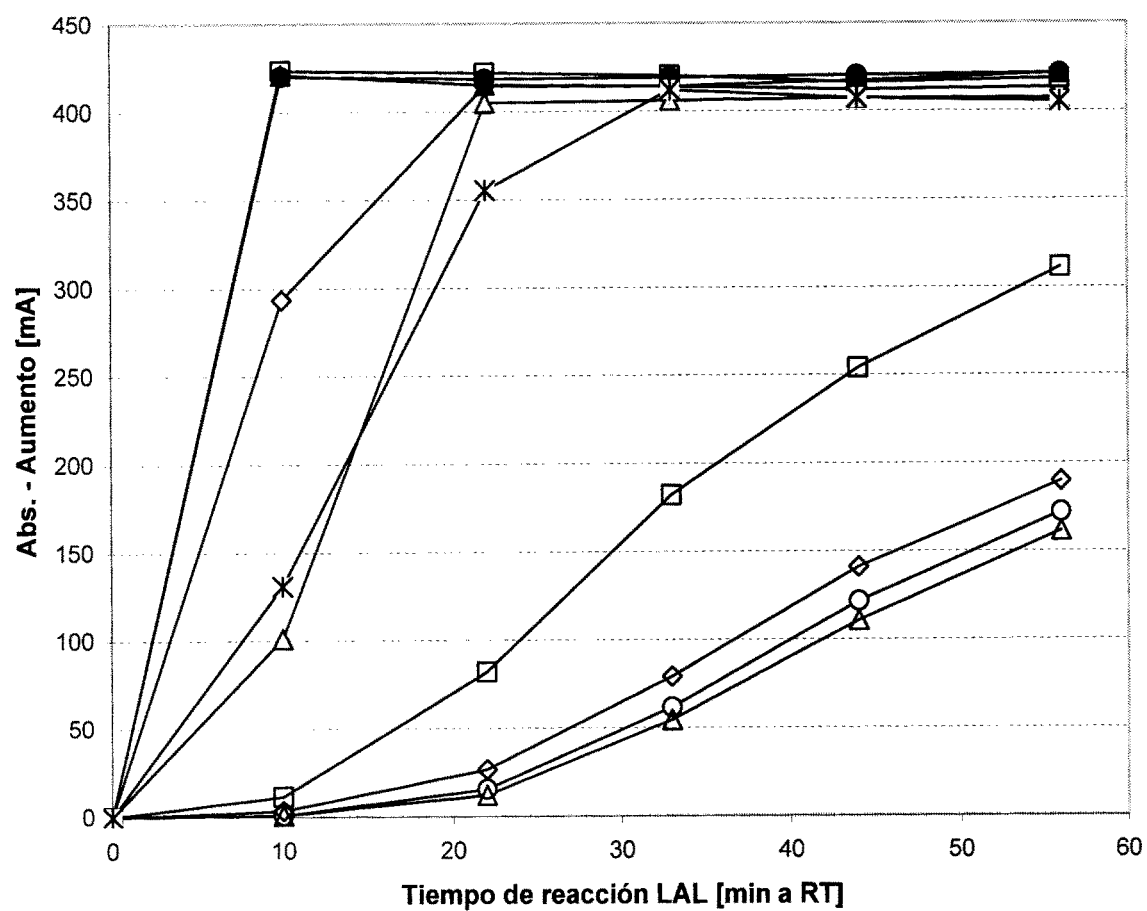


Figura 24a

Fig. 24b

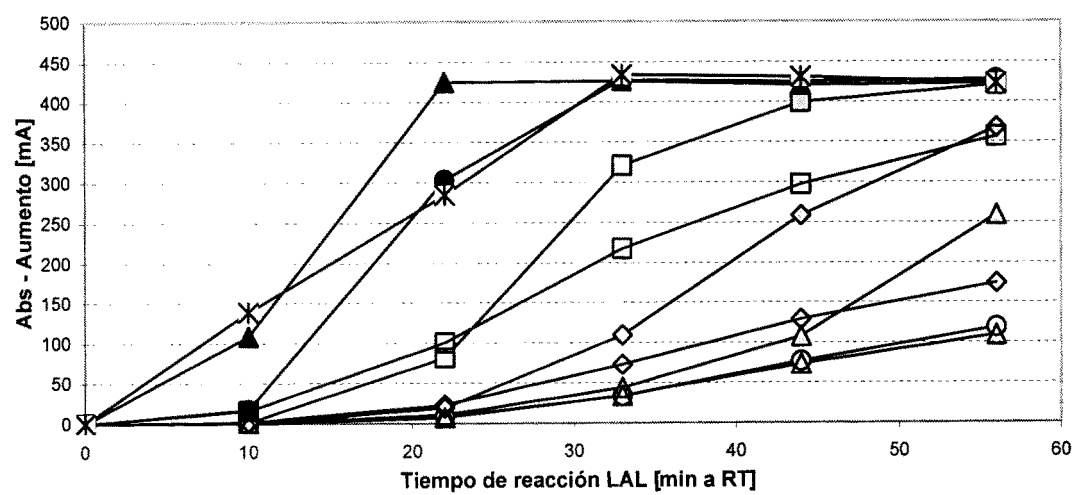


Figura 24b

Fig. 24c

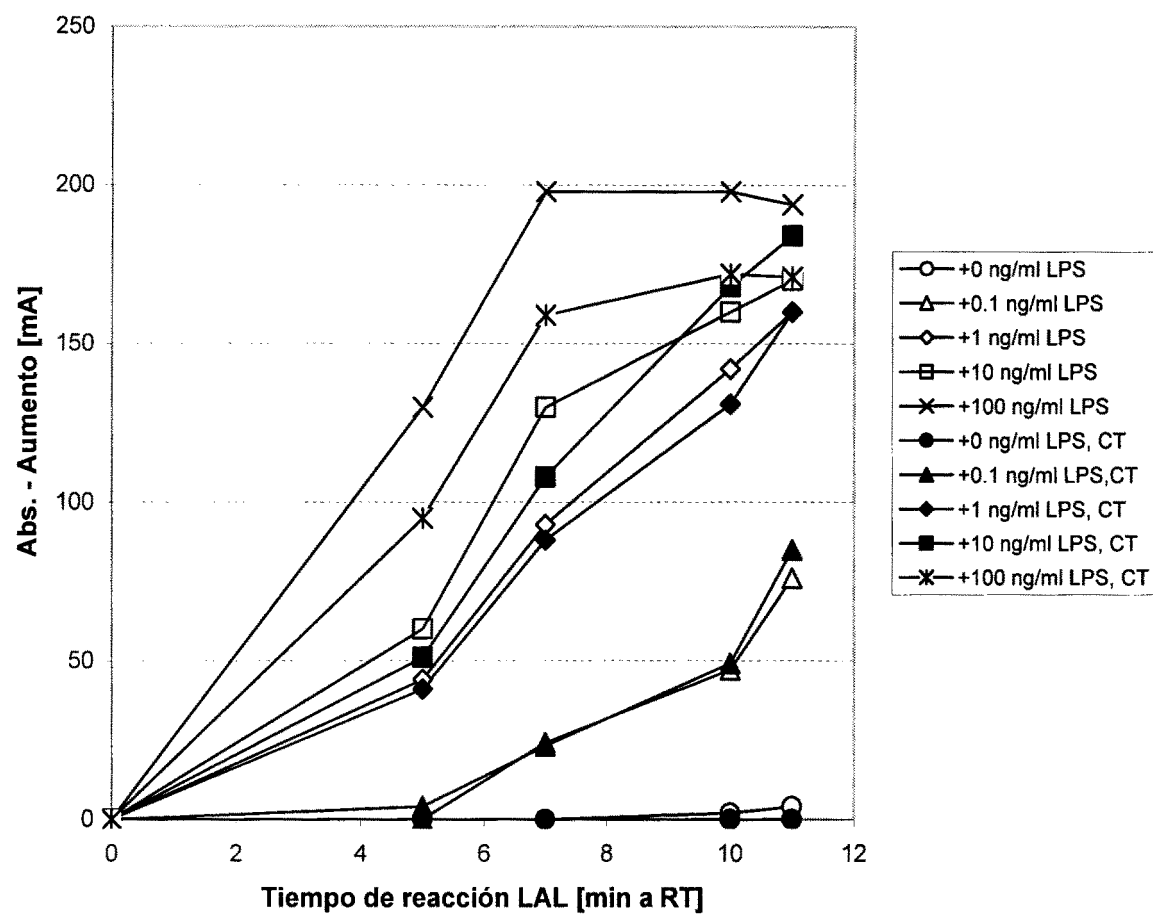


Figura 24c

Fig. 24d

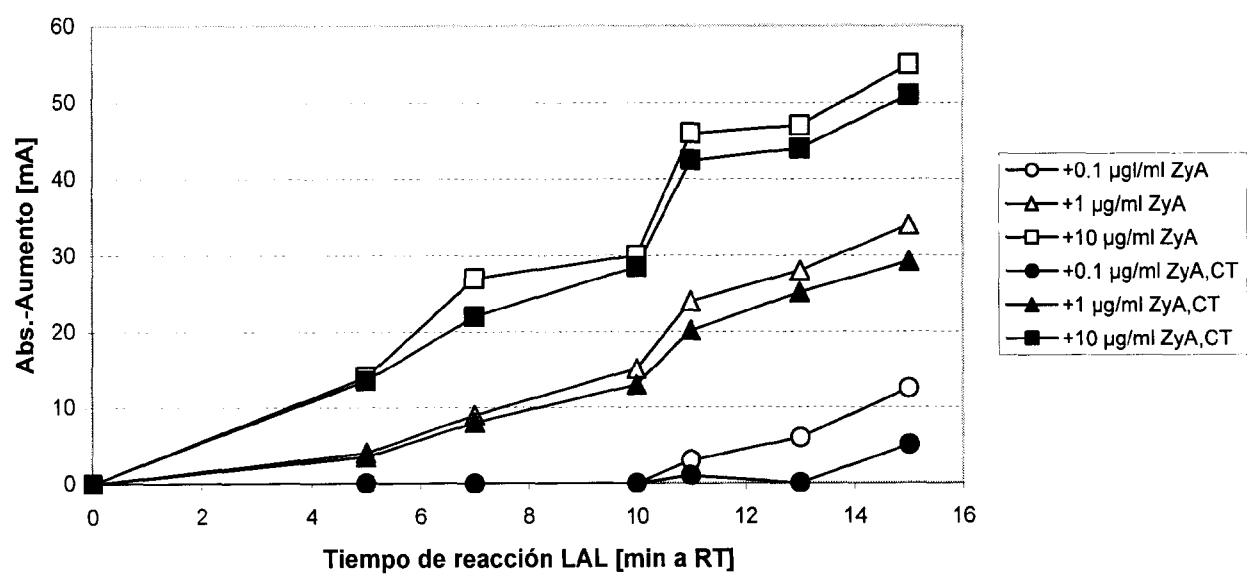


Figura 24d