



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 444**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05017002 .6**
86 Fecha de presentación : **04.08.2005**
87 Número de publicación de la solicitud: **1630558**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

54 Título: **Sistema de test diagnóstico para la detección de anticuerpos contra infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas.**

30 Prioridad: **27.08.2004 DE 10 2004 041 659**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Virion / Serion GmbH**
Friedrich-Bergius-Ring 19
97076 Würzburg, DE

72 Inventor/es: **Hermann, Gerhard y**
Roeschard, Jacqueline

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 293 444 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

Sistema de test diagnóstico para la detección de anticuerpos contra infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas.

La invención se refiere a un sistema de test diagnóstico para la detección de anticuerpos contra patógenos de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas, que presenta al menos un patógeno de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas o fragmentos (proteínas, fragmentos de proteínas, ácidos nucleicos, fragmentos de ácidos nucleicos) de este patógeno como antígeno sonda o detector.

Las neumonías atípicas son provocadas por diferentes microorganismos, en particular virus y bacterias, y se distinguen de la neumonía "clásica" en cuanto a las molestias y el desarrollo. La pulmonía clásica (neumonía) es una inflamación aguda o crónica del tejido pulmonar causada por neumococos (otra denominación de *Streptococcus pneumoniae*). Cuando una neumonía no presenta los síntomas de una neumonía clásica (típica), como es causada por neumococos (*Streptococcus pneumoniae*), se habla de una neumonía atípica.

La neumonía atípica se ve cada vez con más frecuencia. En Alemania son ya más de un 20 por ciento de las neumonías que se adquirieron en el entorno normal del paciente (las llamadas neumonías adquiridas en la comunidad de manejo ambulatorio), las que fueron causadas por patógenos atípicos. Las neumonías atípicas son causadas en la mayoría de los casos por patógenos denominados también atípicos, es decir, legionellas (en particular, *Legionella spp.*), micoplasmas (en particular, *Mycoplasma pneumoniae*), clamidias (en particular, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*), coxiellas (en particular, *Coxiella burnetii*) y rickettsias, así como virus, como p.ej. VSR, parainfluenza, influenza o adenovirus.

Aunque la neumonía atípica es una enfermedad de los pulmones, muchos síntomas característicos de la enfermedad pueden manifestarse fuera de los pulmones, como por ejemplo erupciones cutáneas o dolores articulares. También la neumonía por legionella (la enfermedad del legionario) pertenece a las neumonías atípicas. Por lo tanto, en muchos casos sólo puede realizarse un diagnóstico claro mediante la detección del patógeno en la sangre, el esputo o en otro líquido corporal o en otro tejido del paciente (en el caso de las legionellas, por ejemplo también en la orina del paciente). El desarrollo de una neumonía atípica puede variar mucho. Además de enfermedades leves con una cura rápida y total aún hoy día se presentan también desarrollos con desenlace fatal.

Un problema de las neumonías atípicas sigue siendo la detección en parte difícil de los patógenos al principio de la enfermedad.

- Entre las clamidias se conocen sobre todo la *Chlamydia psittaci* y la *Chlamydia pneumoniae* como causantes de una neumonía atípica. Ambas provocan síntomas de enfermedad similares. No obstante, el desarrollo de las infecciones por *Chlamydia psittaci* es frecuentemente más grave y pueden conducir a neumonías de pronóstico reservado, sobre todo cuando se retrasa el comienzo del tratamiento o cuando no hay tratamiento. Una infección con *C. Psittaci* no se detecta serológicamente cuando sólo se hace un test para detectar *C. Pneumoniae*. Por lo tanto, la distinción entre los dos patógenos es de gran importancia, tanto para el tratamiento como para evitar recaídas.
- Otro problema relacionado con la detección de *C. pneumoniae* y/o *C. psittaci* como presunto patógeno de una neumonía atípica está en que los anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis* (uno de los patógenos más frecuentes en Europa de infecciones del tracto genital) reaccionan de forma cruzada con *C. pneumoniae* y *C. psittaci*. Por lo tanto, en casi todos los tests de detección convencionales que muestran un resultado positivo de *C. pneumoniae* se plantea la pregunta de si se trata de un resultado positivo real o de una infección por *C. trachomatis*. Además, un diagnóstico exacto es todavía más difícil porque las infecciones por *C. trachomatis* tienen frecuentemente un desarrollo subclínico pudiendo persistir los títulos de anticuerpos durante mucho tiempo.

En el estado de la técnica se conoce hasta la fecha sólo un ensayo serológico en el que se usan estas tres especies de *Chlamydia* en combinación (Firma Savyon, comercialización en Alemania por la Firma Hain). Este ensayo es un test de inmunofluorescencia, en el que un portaobjetos presenta para cada una de las tres especies de *Chlamydia* una hilera de cavidades recubierta con antígenos, respectivamente. En cada hilera debe prepararse al menos una de las cavidades con una muestra del mismo suero de paciente para que puedan detectarse anticuerpos presentes mediante un procedimiento basado en la fluorescencia. Puesto que para un test de detección deben prepararse al menos tres cavidades, también se triplica el peligro de fuentes de errores y una comparación directa de los resultados sólo puede hacerse con restricciones.

- En el caso de *C. pneumoniae* existe, además, el problema de que este patógeno puede causar infecciones crónicas. Para poder distinguir entre una primera infección y una infección crónica recidivante, en muchos casos la determinación del título IgA, además del título IgM e IgG es el único procedimiento de diagnóstico fiable. Un título IgM positivo y/o elevado visto por sí solo es un indicio seguro de infecciones agudas, aunque falta frecuentemente en caso de reinfecciones (sobre todo en el caso de patógenos respiratorios virales). Si por lo contrario se trata de una infección pasada o de un estadio tardío de la infección, un resultado positivo de IgG es en muchos casos el único indicio del patógeno de la infección. Sólo la detección

ES 2 293 444 T3

simultánea de las tres clases diferentes de Ig (IgM, IgA, IgG) ofrece suficientes informaciones para una valoración completa del estado de la infección.

- 5 - Además, los resultados de una determinación del título total de IgA ofrecen informaciones acerca de si la infección respiratoria se debe a un defecto inmunológico y el IgE total puede ofrecer informaciones acerca de si los síntomas respiratorios se deben a alergias.
- 10 - En el caso de infecciones por coxiella, el médico debe poder distinguir entre la forma aguda y la forma crónica recidivante, puesto que las terapias son diferentes. En el caso de la enfermedad aguda, el sistema inmunológico del paciente produce sobre todo anticuerpos contra el antígeno de fase II, mientras que en el caso de una enfermedad crónica se encuentran sobre todo títulos elevados de anticuerpos anti-fase I en el suero del paciente.
- 15 - Es necesaria una detección lo más clara y completa posible del patógeno al principio de la enfermedad, para poder empezar rápidamente con una terapia lo más selectiva posible. La medida más importante para el tratamiento de neumonías atípicas es la administración de antibióticos adecuados. Puesto que precisamente en el caso de las neumonías atípicas en muchos casos no es sencilla la detección de los patógenos con procedimientos convencionales y sólo una detección de patógenos clara y completa permite una terapia específica selectiva, los antibióticos se administran forzosamente en la práctica en muchos casos por simple sospecha. Contra los patógenos de la neumonía atípica bacteriana hay fundamentalmente tres grupos de antibióticos eficaces: las tetraciclinas, los antibióticos macrólidos y los llamados inhibidores de la girasa. No obstante, en el caso de *C. psittaci* y *C. pneumoniae* existen indicios que, si bien los macrólidos son adecuados para el tratamiento de *C. pneumoniae*, no lo son en cambio para el tratamiento de *C. psittaci* (fuente Epidemiologisches Bulletin, RKI, 18/97). Por lo tanto, es necesaria una distinción segura entre los
25 dos patógenos para evitar terapias incorrectas (y por consiguiente ineficaces).

La distinción entre patógenos virales y bacterianos es igual de importante, puesto que en el caso de una infección viral, los antibióticos son terapéuticamente ineficaces, cargando en el caso de una toma el cuerpo del paciente con sus efectos secundarios. Por lo tanto, deben distinguirse de la neumonía atípica sobre todo las enfermedades de resfriado
30 causadas por virus y la bronquitis aguda. Hasta la fecha, la auténtica neumonía por virus en muchos casos sólo puede diagnosticarse fiablemente a lo largo de su desarrollo.

Los títulos de anticuerpos pueden persistir durante mucho tiempo. Por ejemplo los anticuerpos contra *Chlamydia ssp* pueden persistir hasta durante 12 meses a un nivel elevado. Con los tests convencionales, en estos casos es difícil
35 decir si un elevado título de anticuerpos se debe a una infección reciente o pasada hace tiempo. Para aclarar esta pregunta puede detectarse y analizarse cuantitativamente en una aplicación de test paralela un marcador para infecciones agudas, p.ej. neopterina o PCR (= proteína C reactiva). En el caso de infecciones por virus, protozoos y bacterias intracelulares, los niveles de neopterina aumentan en los estadios tempranos de la infección, aún antes de la seroconversión. Con la determinación del contenido de neopterina en el suero del paciente se obtiene, por consiguiente, una información
40 adicional, independiente de títulos de anticuerpos específicos, acerca de si existe una infección aguda viral y/o bacteriana o no. Para el diagnóstico diferencial de si existe una infección bacteriana o viral es adecuado el análisis del título de procalcitonina o del título de PCR en el suero del paciente. La procalcitonina es un marcador selectivo para infecciones bacterianas y es, además, fundamentalmente más sensible que los demás parámetros rutinarios de una inflamación.

Por los documentos DE 33 22 373 C2 y EP 0 126 450 se conoce un sistema de test para la detección simultánea de varios antígenos y/o anticuerpos distintos de una muestra, usándose partículas soporte en lugar de las cavidades ELISA conocidas o de las zonas de transferencia (immunoblot/Western/Line). Estas partículas soporte están recubiertas
45 con anticuerpos detectores o sonda y/o antígenos detectores o sonda. Las partículas están marcadas, además, individualmente o por grupos con colorantes fluorescentes de diferentes espectros de emisión y/o con diferentes cantidades de al menos un colorante fluorescente y/o por diferentes tamaños de partículas, de modo que finalmente se presentan varias poblaciones de partículas (cada una formada por una o varias partículas del mismo tipo), de las que cada una está caracterizada por una codificación específica para ella, es decir, la combinación de tamaño, el tipo de colorante
50 fluorescente y la cantidad de colorante fluorescente. Cada población de partículas (grupo de partículas) está cargada, además, de otro tipo de anticuerpos detectores o sonda y/o antígenos detectores o sonda. Una mezcla de estas poblaciones de partículas se mezcla con el líquido (p.ej. suero del paciente), que contiene los antígenos o anticuerpos que han de ser analizados o detectados (antígenos de la muestra o anticuerpos de la muestra). A continuación, se realizan los pasos de reacción de un procedimiento convencional de inmunofluorescencia. Después de un tiempo de reacción
55 definido, durante el cual los antígenos o anticuerpos que han de ser detectados son ligados por anticuerpos o antígenos que recubren las partículas, se procede a la identificación de los antígenos o anticuerpos ligados mediante la introducción de un líquido con anticuerpos y/o antígenos marcados con fluorescencia, que reaccionan de forma específica según la especie con los antígenos o los anticuerpos que han de ser detectados o analizados. Al final se mide cada
60 partícula con un medidor, p.ej. un citómetro de flujo, para determinar su codificación, es decir, el tamaño y el espectro de emisión de fluorescencia y la intensidad de fluorescencia. Con ayuda de estos datos de medición pueden sacarse conclusiones acerca de la presencia de los antígenos o anticuerpos que han de ser analizados.

65 Martins T. B. describe en CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, tomo 9, N° 1, 2002, pág. 41-45 un sistema de test diagnóstico para la detección de anticuerpos contra siete patógenos exclusivamente virales de infecciones respiratorias agudas, es decir, Influenza A y B, Adenovirus, Parainfluenza 1, 2, 3 y VSR. Los anti-

genos están acoplados a partículas soporte, que presentan por grupos diferentes marcajes con colorantes fluorescentes, es decir, cada población de partículas soporte está codificada mediante una coloración fluorescente determinada. El sistema de test presenta, además, una población de partículas soporte codificadas con colorante fluorescente con sondas/marcadores acoplados a las mismas para la detección de anticuerpos IgG y una población de partículas soporte codificadas con colorante fluorescente con sondas/marcadores acoplados a las mismas para la detección de anticuerpos IgM.

De Gendral *et al.*, *Pediatr Infect Dis J* 1999; Vol. 18 N° 10, pág. 875 - 881 se sabe que la procalcitonina y la proteína C reactiva son adecuadas como marcadores para la diferenciación entre infecciones bacterianas y virales.

Van Dissel, *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 70-73 describe y compara marcadores de infecciones, en particular proteína C reactiva, procalcitonina y neopterinina.

Chauhan *et al.*, *Indian J Med res [B]* 92, agosto de 1990, pág. 241 - 245 describen que en pacientes con EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) se encuentran en parte títulos elevados de IgA (e IgG), mientras que los títulos de IgM permanecen por lo visto sin cambios.

De Baldacci *et al.*, *Eur Respir J* 2001, 17; pág. 773-790 es conocido que es posible determinar alergias mediante el IgE en suero.

Oldach *et al.*, *Clinical Infectious Diseases* 1993; Vol. 17, pág. 338-343 describen la detección de antígenos de *Chlamydia psittaci* mediante un test directo de inmunofluorescencia usándose IFT y anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia contra el antígeno.

La presente invención tiene el objetivo de proporcionar un sistema de test para el diagnóstico de anticuerpos contra patógenos de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas que pueda realizarse rápidamente, que dé resultados específicos fiables y que permita la detección y la identificación de todos los anticuerpos relevantes contra los patógenos (en particular, bacterias, virus, microplasmias) de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas, así como la determinación del estadio de infección (primera infección, persistencia, reactivación) en un solo ciclo de trabajo.

Este objetivo se consigue proporcionándose un sistema de test según las reivindicaciones 1 - 14, es decir, un sistema de test para el diagnóstico de anticuerpos contra patógenos de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas, que presenta patógenos de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas o fragmentos antigénicos (proteínas, fragmentos de proteínas, ácidos nucleicos, fragmentos de ácidos nucleicos) de estos patógenos como antígenos sonda o detectores, estando acoplados estos antígenos sonda o detectores a partículas soporte que están marcadas individualmente o por grupos, de modo que se presentan varias poblaciones de partículas, formadas por una o varias partículas del mismo tipo, respectivamente, de las que cada una está codificada mediante un marcaje específico para la misma y que está caracterizada porque que los patógenos se eligen del grupo I: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii* fase 1 y 2, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, o del grupo II: Parainfluenza 1, 2, 3, VSR, Adenovirus, Influenza A y B, Picomavirus, virus de varicela-zoster, virus de sarampión, porque el sistema de test presenta, además, al menos un marcador para enfermedades infecciosas agudas (llamado "marcador de fase aguda") y al menos un marcador para infecciones bacterianas, porque los marcadores también están acoplados a partículas soporte y porque cada población de partículas está cargada con otro tipo de antígeno sonda o detector o marcador.

El sistema de test según la invención ofrece sobre todo la ventaja de que se puede obtener una respuesta serológica informativa a las preguntas de si existe una infección respiratoria aguda y/o una neumonía atípica y, dado el caso, el desarrollo y el estado de la infección con ayuda de una sola aplicación del test con una sola muestra de suero del paciente en cuestión. Con los sistemas de test convencionales debería realizarse para ello una pluralidad de aplicaciones de test (debido a la pluralidad de los potenciales patógenos específicos, además de posibles reacciones alérgicas y/o posibles superposiciones de infecciones persistentes y recientes). No obstante, está limitado el número de tests que pueden realizarse debido a la restricción de costes cada vez más estricta en el sistema sanitario, lo cual conduce a una elección más o menos arbitraria de unos pocos parámetros. El análisis simultáneo de varios parámetros que puede realizarse con el sistema de test según la invención permite un diagnóstico más rápido y con mayor eficiencia de los costes (en particular en comparación con las aplicaciones de análisis separadas convencionales) resultando de ello una terapia correspondientemente específica y eficaz.

En una forma de realización preferible del sistema de test según la invención se usan como patógenos del grupo I *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Bordetella pertussis* y, además, *Chlamydia trachomatis*, preferiblemente también *Coxiella burnetii* fase 1 y 2 y Legionella.

Este sistema de test va dirigido especialmente a la detección de enfermedades respiratorias causadas por bacterias. Los patógenos *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Bordetella pertussis*, así como los virus pueden provocar neumonías atípicas primarias que no pueden distinguirse sólo con ayuda de la sintomatología. La *Chlamydomphila trachomatis*, en cambio, provoca infecciones del tracto genital y es una de las enfermedades venéreas más frecuentes en Europa. No obstante, estas infecciones tienen en muchos casos un desarrollo subclínico y quedan, por lo tanto, sin diagnosticar pudiendo persistir los títulos de anticuerpos du-

rante mucho tiempo. Los anticuerpos contra *Chlamydophyla trachomatis* reaccionan en muchos casos también con *Chlamydophyla pneumoniae* y *Chlamydophyla psittaci*. La detección de anticuerpos contra *Chlamydophyla trachomatis* en esta variante del sistema de test según la invención indica eventuales reacciones cruzadas y permite una afirmación diagnóstica en el sentido de si un resultado de test positivo de *Chlamydophyla pneumoniae* indica realmente una infección con *Chlamydophyla pneumoniae* o si existe sólo o también una infección con *Chlamydophyla trachomatis*.

Las infecciones con *Chlamydophyla psittaci* provocan una sintomatología similar a la de las infecciones con *Chlamydophyla pneumoniae*, teniendo las infecciones con *Chlamydophyla psittaci* en muchos casos un desarrollo más grave, pudiendo llevar incluso a neumonías de pronóstico reservado, sobre todo cuando se retrasa el comienzo del tratamiento o en caso de no tratarlas. Una infección con *Chlamydophyla psittaci* no se detecta serológicamente cuando sólo se comprueba la presencia de *Chlamydophyla pneumoniae*. No obstante, es de gran importancia la distinción entre los dos patógenos, tanto para el tratamiento como para evitar recaídas. El tratamiento de los dos patógenos se realiza mediante administración de antibióticos. Sin embargo, hay indicios de que algunos antibióticos son adecuados para el tratamiento de *Chlamydophyla pneumoniae*, pero no lo son para el tratamiento de *Chlamydophyla psittaci*. Una distinción segura entre los dos patógenos es necesaria para evitar terapias incorrectas y, por lo tanto, ineficaces, y puede realizarse fácilmente con el sistema de test según la invención.

En otra forma de realización también preferible del sistema de test según la invención se usan como patógenos Parainfluenza 1, 2, 3, VSR, Adenovirus, Influenza A y B, además de usarse preferiblemente también virus de varicela-zoster y virus de sarampión.

Este sistema de test va dirigido especialmente a la detección de enfermedades respiratorias causadas por virus, permite obtener un diagnóstico diferencial rápido y evitar un uso innecesario de antibióticos.

En otra forma de realización también preferible del sistema de test según la invención se usan como patógenos del grupo I *Chlamydophyla pneumoniae*, *Chlamydophyla psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, así como *Bordetella pertussis* y como patógenos del grupo II Parainfluenza 1, 2, 3, VSR, Adenovirus, así como Influenza A y B y adicionalmente *Chlamydia trachomatis*.

Este sistema de test es especialmente adecuado para el análisis de niños pequeños, puesto que comprende los patógenos más importantes de neumonías en niños pequeños. Precisamente en niños pequeños es deseable testar paralelamente varios parámetros, puesto que sólo pueden obtenerse pequeñas cantidades de sangre del paciente. Este sistema de test permite un diagnóstico diferencial rápido, el uso específico de antibióticos en el caso de infecciones bacterianas y evitar terapias innecesarias de antibióticos en el caso de infecciones virales.

Como marcadores para infecciones agudas, el sistema de test según la invención presenta preferiblemente neopterina. Los títulos de anticuerpos contra patógenos de infecciones respiratorias pueden persistir durante un tiempo muy largo, en el caso de *Chlamydophyla pneumoniae* pueden estar, por ejemplo, hasta 12 meses a un nivel elevado. Por lo tanto, en los tests convencionales es frecuentemente difícil distinguir si un título elevado de anticuerpos es debido a una infección reciente o antigua. La neopterina es un producto de descomposición del metabolismo humano natural y se forma en mayores cantidades cuando existen infecciones. En el caso de infecciones por virus, protozoos y/o bacterias intracelulares, el nivel de neopterina sube claramente ya en estadios tempranos de la infección, aún antes de la seroconversión. Con la determinación según la invención del nivel de neopterina se obtiene una información en el sentido de un diagnóstico diferencial acerca de la presencia de infecciones agudas virales y/o bacterianas. Como marcadores para infecciones bacterianas se usa en el sistema de test según la invención preferiblemente procalcitonina. La procalcitonina es fundamentalmente más sensible como indicador para infecciones bacterianas que los demás parámetros rutinarios de inflamación conocidos hasta la fecha.

El uso de procalcitonina según la invención, preferiblemente en combinación con neopterina, en el sistema de test según la invención permite distinguir de forma sencilla entre infecciones causadas por bacterias y por virus.

En lugar de procalcitonina y/o neopterina también puede usarse PCR (proteína C reactiva).

La PCR es, por un lado, un marcador de fase aguda, que sube ya en las primeras horas después de una infección y alcanza su valor máximo después de 24 - 48 horas. Al mismo tiempo, este marcador permite un diagnóstico diferencial entre infecciones de naturaleza viral y bacteriana, puesto que la PCR aumenta sólo poco en el caso de infecciones virales, aumentando por lo contrario mucho en el caso de infecciones bacterianas.

El uso de marcadores para IgA total está previsto para detectar la eventual existencia de un defecto inmunológico. Esto permite una afirmación diagnóstica acerca de si las infecciones respiratorias se deben (también) a un defecto inmunológico o no.

El uso de marcadores para IgE total está previsto para detectar alergias eventualmente existentes. Esto permite una afirmación diagnóstica acerca de si los síntomas respiratorios (también) se deben a alergias o no y si es indicada una terapia específica o no. Dado el caso, puede realizarse una terapia adecuada evitándose la administración innecesaria de antibióticos.

ES 2 293 444 T3

En la práctica ha resultado ser especialmente adecuado el látex como material para las partículas soporte. Una forma de realización preferible del sistema de test según la invención se caracteriza, por consiguiente, porque las partículas soporte están realizadas en forma de partículas de látex.

5 En la comprobación en la práctica, además, ha resultado ser muy ventajosa una variante en la que se presentan varias poblaciones de partículas, teniendo las partículas de todas las poblaciones el mismo tamaño de partícula, preferiblemente entre $1 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$, y estando marcadas las mismas con el mismo colorante fluorescente presentando, no obstante, cada población de partículas otra intensidad de fluorescencia.

10 En otra forma de realización especialmente preferible para la aplicación práctica, el sistema de test diagnóstico según la invención comprende adicionalmente (en primer lugar) la indicación de una curva de referencia para cada anticuerpo que ha de ser detectado (es decir, complementario a los antígenos sonda), que refleja la correlación (la relación) entre la concentración de anticuerpos en el volumen de la muestra y la intensidad de la señal de fluorescencia medida y (en segundo lugar) un suero estándar que contiene todos los anticuerpos que han de ser detectados, es decir, complementarios a los antígenos sonda, en concentraciones conocidas. Las curvas de referencia específicas para los anticuerpos se describen con la fórmula:

$$\text{Count} = A + \frac{D-A}{1 + e^{B(C-1n \text{ conc.})}}$$

25 0

$$\text{Conc.} = \exp\{C-1n[D-A]/(\text{Count}-A)-1\}/B\}$$

30 con

Count = valor medio de las señales de fluorescencia medidas

A = asíntota inferior de la curva de referencia

35 B = gradiente de la curva de referencia

C = punto de inflexión de la curva de referencia

D = asíntota superior de la curva de referencia.

40 Esta fórmula de referencia es conocida por el estado de la técnica, por ejemplo por el documento DE 36 39 279 C3 en combinación con Van Loon y Van der Veen en *J. Clin. Pathol.* 33, 635-639, 1980 y Van Loon *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 34, 1981, 665-669 y Dundley, R. A., Edwards, P., Ekins, R. P., Finney, D. J., McKenzie, J. G. M., Raab, G. M., Rodbard, D., and Rodgers, R. P. C. (1985) "Guideline for immunoassay data processing." *Clin. Chem.* 31, 1264-1271.

45 Los parámetros A, B, C y D específicos de las curvas de referencia se determinan de forma experimental con el método de la titulación habitual, conocido por el experto (serie geométrica de diluciones) de sueros de calibración (p.ej. estándares internacionales o nacionales). Preferiblemente se determina la curva de referencia para cada anticuerpo (analito) que ha de ser detectado y para cada uno de sus lotes de fabricación en varias aplicaciones de test manteniéndose condiciones óptimas. Esto conlleva la ventaja que el usuario, en particular el médico o el personal de laboratorio, no tiene que elaborar curvas de referencia de este tipo, evitándose este proceso caro que requiere mucho tiempo.

Con ayuda del suero estándar se recalibran las curvas de referencia específicas de los anticuerpos, es decir, se adaptan a las condiciones de test reales y actuales.

55 En la recalibración (corrección del día) se determina la relación entre el estado real (valor real) y el estado teórico (valor teórico) que se tiene en cuenta de la siguiente manera en la fórmula de la curva de referencia arriba indicada:

$$\text{Conc.} = \exp\{C-1n[(D-A)/((\text{Count}-\text{VBC}) \cdot \text{STD}_{\text{teór.}}/(\text{STD}_{\text{real}}-\text{VBC})-A)-1]/B\}$$

60 con

VGC = valor blanco conjugado

65 $\text{STD}_{\text{teór.}}$ = valor teórico del estándar

STD_{real} = valor actual del día del estándar

ES 2 293 444 T3

En la aplicación práctica, el cálculo correspondiente de esta fórmula se realiza preferiblemente con ayuda de ordenadores y un software de evaluación correspondiente, de modo que los resultados calculados de la cuantificación se obtienen casi al mismo tiempo que los datos de medición realmente determinados en la aplicación del test de diagnóstico.

Con una calibración de este tipo se compensan variaciones del test y se comprueba la calidad de la aplicación del test.

Esta variante del sistema de test según la invención permite una evaluación cuantitativa de los resultados de test. Con ayuda de esta evaluación cuantitativa es posible llegar a afirmaciones de si un resultado positivo del test realmente indica una infección aguda con el patógeno correspondiente o si se presenta un título de anticuerpos debido a una infección antigua o a una reacción cruzada.

A continuación, la invención se explicará más detalladamente con ayuda de ejemplos de realización.

Ejemplo 1

Codificación de partículas

A diferencia de la técnica ELISA, en la que las paredes de las cavidades de la placa de microvaloración sirven para el acoplamiento adsorptivo de los analitos o anticuerpos, en el sistema de test según la invención se usan partículas soporte, preferiblemente partículas de látex, con un diámetro de por ejemplo $4,0 \mu\text{m}$ como fase sólida. Las partículas, que en principio no se pueden distinguir, están teñidas en este ejemplo con diferentes intensidades del mismo fluoróforo rojo, por lo que se obtiene un surtido de siete grupos de partículas de látex teñidos de rojo con distintas intensidades (poblaciones de partículas).

Cada grupo (cada población de partículas) se recubre con distintos antígenos, es decir, en cada grupo de partículas se inmoviliza de forma covalente o no covalente un determinado tipo de antígeno, por ejemplo de la siguiente manera:

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 1: con *Chlamydia trachomatis*

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 2: con *Mycoplasma pneumoniae*

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 3: con *Bordetella pertussis*

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 4: con Parainfluenza 1

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 5: con Parainfluenza 2

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 6: con Parainfluenza 3

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 7: con VSR

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 8: con Adenovirus

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 9: con Influenza A

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 10: con Influenza B

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 11: con neopterina

Grupo de partículas/población de partículas con intensidad de rojo 12: con procalcitonina

Para poder realizar ahora al mismo tiempo varios análisis en una preparación a testar, los grupos de partículas recubiertos de antígenos (poblaciones de partículas) se mezclan para obtener un llamado cocktail a testar. Un cocktail a testar de este tipo (es decir, una mezcla de grupos de partículas concreta de este tipo) que presenta, por ejemplo, los antígenos *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, Parainfluenza 1, 2, 3, VSR, Adenovirus, Influenza A y B (o, dado el caso, también sólo fragmentos de estos antígenos), así como neopterina y procalcitonina representa una variante de realización del sistema de test según la invención. La variante de realización indicada está prevista sobre todo para análisis en niños pequeños y es adecuada para ello, puesto que comprende todos los patógenos importantes de neumonías en niños pequeños.

En la fig. 1 están representadas las diferentes etapas de la codificación de partículas y la elaboración del sistema de test. La fig. 1 (A) muestra la codificación de las partículas con el fluoróforo rojo en diferentes grados de intensidad. La fig. 1 (B) muestra el recubrimiento de las partículas con el antígeno. La fig. 1 (C) muestra la mezcla de las partículas recubiertas para obtener el cocktail a testar.

Ejemplo 2

Realización de un test para aclarar la pregunta si un paciente tiene anticuerpos contra patógenos de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas o no

Una mezcla de grupos de partículas elaborada preferiblemente según el ejemplo 1 se mezcla e incuba con una cantidad determinada de suero del paciente. Durante la incubación, los anticuerpos existentes en el suero del paciente ("anticuerpos del paciente") se acoplan a aquellas partículas de látex que están recubiertas con el antígeno que corresponde a su especificidad.

A continuación, se añade un anticuerpo conjugado a la (solución de) muestra, por ejemplo, un anticuerpo de cabra policlonal dirigido contra anticuerpos humanos, que reacciona con el anticuerpo del paciente ligado a las partículas de látex, es decir, que se liga a éste. Este anticuerpo conjugado está marcado preferiblemente con otro colorante fluorescente, presentando este otro colorante fluorescente otro espectro de emisión o al menos otra intensidad de colorante que el colorante fluorescente con el que están marcados/marcadas los/las (grupos de) partículas. En este ejemplo se eligió un fluoróforo verde.

La cantidad de moléculas conjugadas ligadas es proporcional a la concentración de anticuerpos. En la fig. 2 se vuelven a representar las diferentes etapas de la realización del test. La fig. 2 (A) muestra el cocktail a testar preparado, la fig. 2 (B) muestra la introducción del suero del paciente con los anticuerpos del paciente específicos del paciente. La fig. 2 (C) muestra la introducción del anticuerpo conjugado (con fluorescencia verde). La fig. 2 (D) muestra el recipiente de reacción durante la detección en el citómetro de flujo.

Ejemplo 3

Evaluación del test

El sistema de test elaborado y usado preferiblemente según el ejemplo 1 y el ejemplo 2 porta ahora para cada grupo de partículas de látex, respectivamente, una cantidad variable de la fluorescencia conjugada en su superficie y se analiza preferiblemente con ayuda de un citómetro de flujo especializado para mediciones de partículas, un llamado medidor de flujo de partículas fluorescentes.

Estos medidores analizan las partículas de látex individuales según su fluorescencia y pueden distinguir al mismo tiempo tres colores de fluorescencia diferentes (naranja, rojo, rojo oscuro).

En este ejemplo, el citómetro de flujo analiza, por un lado, con ayuda de la emisión roja los diferentes grupos de partículas y, por lo tanto, los distintos antígenos y, por otro lado, con ayuda de la emisión verde la cantidad de anticuerpos conjugados ligados y, por lo tanto, la cantidad de anticuerpos ligados del paciente para cada grupo de partículas, es decir, para cada antígeno específico.

Una gran ventaja de este análisis por citometría de flujo está en que en la mayoría de los casos los usuarios ya disponen de los equipos correspondientes. Además, se aumenta el rendimiento diagnóstico de los tests inmunológicos gracias a la mayor sensibilidad del marcaje por fluorescencia en comparación con la reacción cromática de ELISA. Con ayuda de un software, el equipo clasifica la fluorescencia de cada partícula según el grupo de partículas adecuado y asigna los valores correspondientes determinados del analito. La fluorescencia media del conjugado por grupo de partículas es una medida para la concentración del analito correspondiente en la muestra de suero.

En la fig. 3 se vuelven a representar las diferentes etapas para la evaluación del test. La fig. 3 (A) muestra el recipiente de reacción durante la detección en el citómetro de flujo. La fig. 3 (B) muestra la imagen de detección de la emisión roja y permite, por lo tanto, la identificación de las distintas poblaciones de partículas cargadas con antígenos específicos. La fig. 3 (C) muestra la imagen de detección de la emisión verde y permite, por lo tanto, la identificación y asignación de la cantidad de anticuerpos conjugados por población de partículas.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de test diagnóstico para la detección de anticuerpos contra patógenos de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas, que presenta patógenos de infecciones respiratorias agudas y neumonías atípicas o fragmentos antigénicos de estos patógenos como antígenos sonda, estando acoplados estos antígenos sonda a partículas soporte que están marcadas individualmente o por grupos de modo que se presentan varias poblaciones de partículas, formadas por una o varias partículas del mismo tipo, respectivamente, de las que cada una está codificada mediante un marcaje específico para la misma, es decir, la combinación de tamaño, espectro de emisión de fluorescencia e intensidad de fluorescencia, **caracterizado** porque

- los patógenos se eligen del grupo I: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii* fase 1 y 2, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, o del grupo II: Parainfluenza 1, 2, 3, VSR, Adenovirus, Influenza A y B, Picomavirus, virus de varicela-zoster, virus de sarampión,

- el sistema de test presenta, además, al menos un marcador para enfermedades infecciosas agudas y al menos un marcador para infecciones bacterianas,

- los marcadores también están acoplados a partículas soporte y

- cada población de partículas está cargada con otro tipo de antígeno sonda o marcador.

2. Sistema de test según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como patógenos del grupo I se usan *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Bordetella pertussis* y, además, *Chlamydia trachomatis*.

3. Sistema de test según la reivindicación 2, **caracterizado** porque presenta, además, los patógenos *Coxiella burnetii* fase 1 y 2 y *Legionella pneumophila*.

4. Sistema de test según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como patógenos del grupo II se usan Parainfluenza 1, 2, 3, VSR, Adenovirus, Influenza A y B.

5. Sistema de test según la reivindicación 4, **caracterizado** porque presenta, además, los patógenos virus de varicela-zoster y virus de sarampión.

6. Sistema de test según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como patógenos del grupo I se usan *Chlamydomphila pneumoniae* y/o *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, así como *Bordetella pertussis* y como patógenos del grupo II Parainfluenza 1, 2, 3, VSR, así como Adenovirus, Influenza A y B y adicionalmente *Chlamydia trachomatis*.

7. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque como marcadores para infecciones agudas se usa neopterina o PCR (= proteína C reactiva).

8. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque como marcadores para infecciones bacterianas se usa procalcitonina neopterina o PCR (= proteína C reactiva).

9. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque presenta adicionalmente al menos un marcador para IgA total y/o al menos un marcador para IgE total.

10. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque las partículas soporte son partículas de látex.

11. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque las partículas soporte presentan individualmente o por grupos tamaños de partículas idénticos o diferentes y/o están marcadas con sustancias fluorescentes de diferentes espectros de emisión y/o diferentes intensidades, de modo que la codificación de cada población de partículas está formada por la combinación específica de tamaño, espectro de emisión de fluorescencia e intensidad de fluorescencia.

12. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque se presentan varias poblaciones de partículas, presentando todas las partículas el mismo tamaño, estando marcadas todas las partículas con el mismo colorante fluorescente, pero presentando cada una de las poblaciones de partículas otra intensidad de fluorescencia.

13. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque las partículas soporte presentan un tamaño entre 1 μm y 10 μm .

14. Sistema de test según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque comprende, además,

ES 2 293 444 T3

- (i) para cada uno de los anticuerpos complementarios de los antígenos sonda la indicación de una curva de referencia que refleja la relación entre la concentración de anticuerpos en el volumen de la muestra y la intensidad de la señal de fluorescencia y que está descrita por la función:

5 específicas para los anticuerpos se describen con la fórmula

$$\text{Count} = A + \frac{D-A}{1 + e^{B(C-1n \text{ conc.})}}$$

o

$$\text{Conc.} = \exp\{C-1n[(D-A)/(Count-A)-1]/B\}$$

con

Count = valor medio de las señales de fluorescencia medidas

A = asíntota inferior de la curva de referencia

B = gradiente de la curva de referencia

C = punto de inflexión de la curva de referencia

D = asíntota superior de la curva de referencia

30 pudiendo determinarse los parámetros A, B, C y D de forma experimental mediante titulación de sueros de calibración y

- (ii) un suero estándar que contiene todos los anticuerpos complementarios de los antígenos sonda en concentraciones conocidas y que es adecuado y está previsto para la recalibración de la curva de referencia de cada anticuerpo.

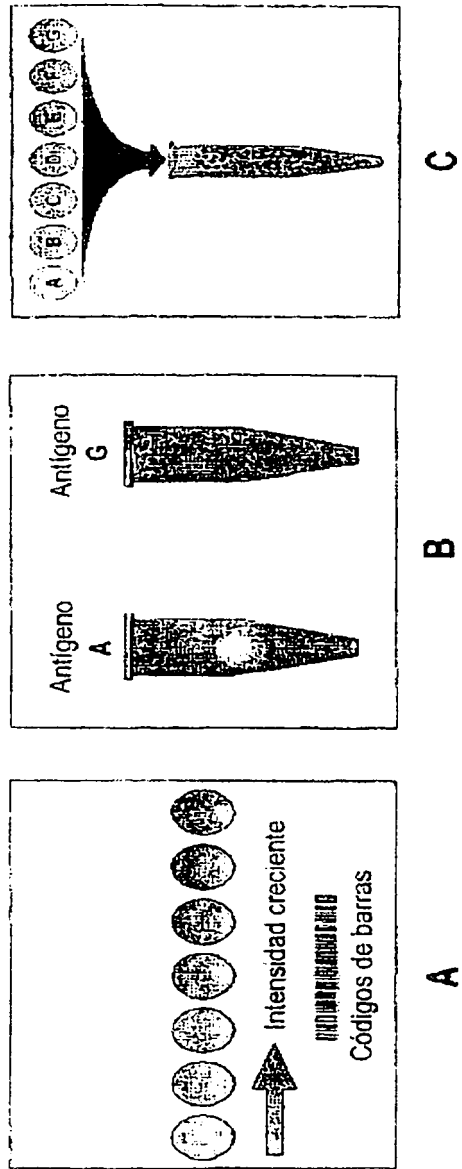


Fig. 1

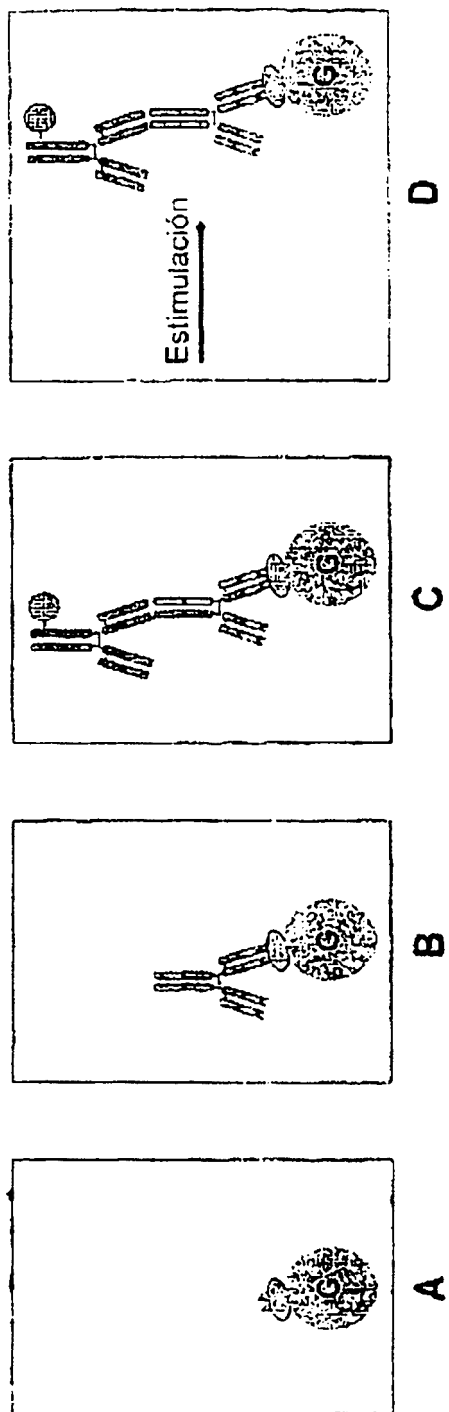


Fig. 2

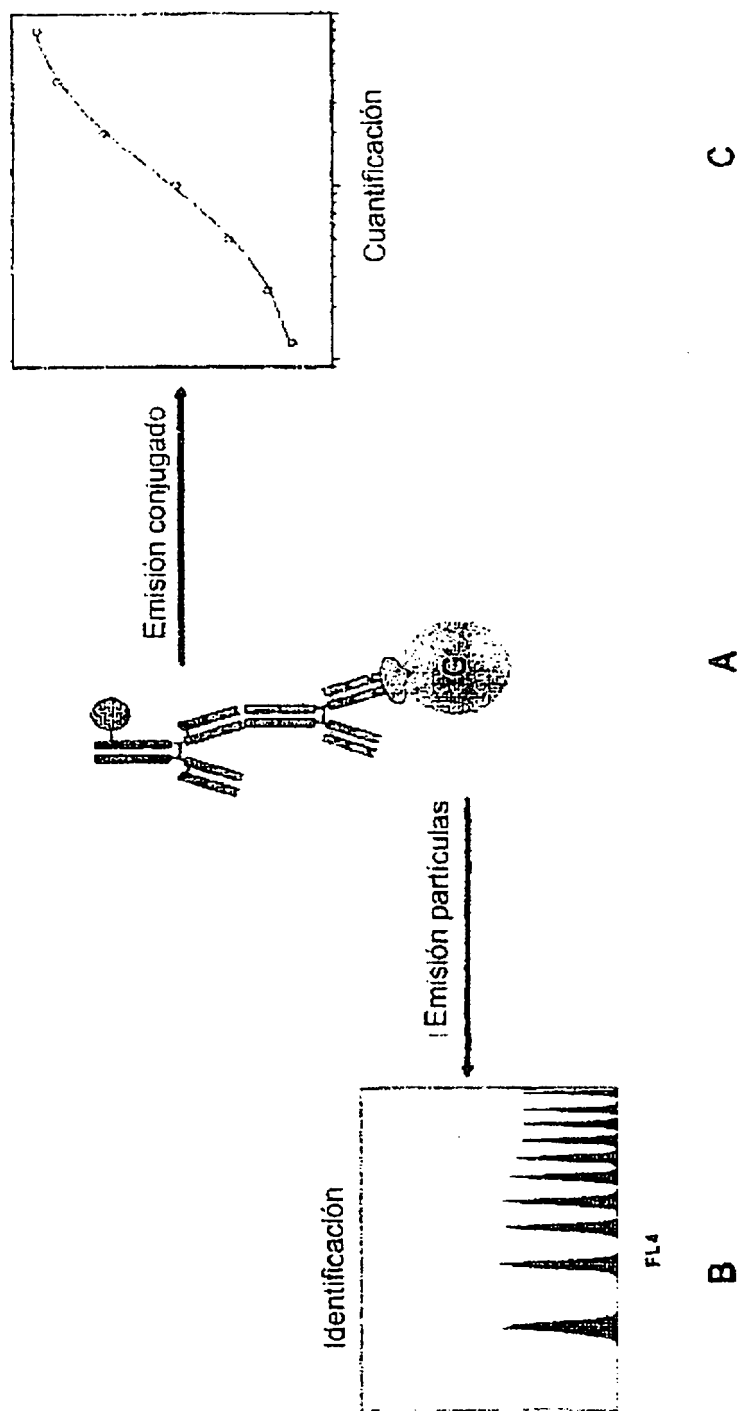


Fig. 3